

Cesar Arthur Martins Chornobai

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO QUÍNICO E DERIVADOS
ANTIOXIDANTES DA ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)**

**CURITIBA
Agosto – 2008**

CESAR ARTHUR MARTINS CHORNOBAI

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO QUÍNICO E DERIVADOS ANTIOXIDANTES DA
ERVA MATE (*Ilex paraguariensis*)**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor. Programa de Pós-
Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Professor Brás Heleno de Oliveira

**CURITIBA
2008**

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa
n.33/16

C551 Chornobai, Cesar Arthur Martins

Determinação do ácido quínico e derivados antioxidantes da erva mate
(*Ilex paraguariensis*). / Cesar Arthur Martins Chornobai. -- 2016.
170 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química.
Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

1. Erva-mate. 2. Ácidos (Química). 3. Antioxidantes (Química). 4. Fenóis.
5. Cromatografia a líquido de alta eficiência. I. Oliveira, Brás Heleno de. II.
Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 540

TERMO DE APROVAÇÃO

DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES ANTIOXIDANTES DA ERVA-MATE (*ILEX* *PARAGUARIENSIS* ST. HIL.)

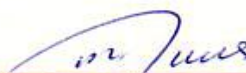
por

CESAR ARTHUR MARTINS CHORNOBAI

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Dep. de Química – UFPR



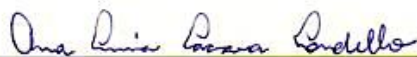
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
Dep. de Química – UFSC



Prof. Dr. Jose Domingos Fontana
Dep. de Farmácia – UFPR



Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Dep. de Química – UFPR



Profª Drª Ana Luisa Lacava Lordello
Dep. de Química – UFPR

DEDICATÓRIA

Este trabalho, na íntegra, é dedicado à minha família: minha mãe Niredes, companheira constante em pensamento, oração e amor incondicional. Ao meu pai Eloy (*in memoriam*) que do meu pensamento não sai. Ao meu irmão Eloy Jr., disponibilidade e coração em pessoa. Ao meu sogro Helcio e minha sogra Vilma, sempre presentes, quando eu estava ausente. À minha amada esposa Gisele, verdadeira amiga e prova incontestada da parceria, que em cada instante e em cada palavra concebida para idealização deste trabalho esteve comigo, e aos meus filhos, João Vítor e Rafael, razão de ser de todos os esforços, sacrifícios e conquistas empenhadas para a concepção desta obra, que não é perfeita, mas carrega uma parte de nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Aos professores, coordenadores e diretores do Câmpus Ponta Grossa da UTFPR, que possibilitaram esta parceria com a UFPR e viabilizaram mecanismos para substituição, adequação de horários, liberação parcial, e em alguns momentos integral, para minha dedicação ao Curso: Prof. Luiz Simão Staszczak, Luiz Alberto Pilatti e José Luiz Ferreira da Trindade. Aos colegas da COALM: Marcela Fonseca Santos e Elenise Sauer pelo apoio e carinho. À Maria Helene Giovanetti Canteri pela indiscutível boa vontade, paciência, disponibilidade e conhecimento. Ao amigo Ciro Maurício Zimmermann pelo estímulo, amizade e parceria e também ao amigo Fábio Edenei Mainginski, prontamente respondendo aos pedidos de auxílio.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de aperfeiçoamento, em especial ao Curso de Pós-Graduação em Química: aos professores do curso, pelo exemplo e pela contribuição na formação; à Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Lameiro Noronha Sales Maia, sempre preocupada com os resultados do meu trabalho e portadora de palavras de estímulo constante, ao secretário Marcelino Câmara, pela paciência no atendimento e atenção às datas e ocorrências, ao Sr. Paulo Andrade, técnico vidreiro, que com sua habilidade e presteza permitiram reparos imediatos em materiais de fundamental importância aos experimentos.

Aos atenciosos e dedicados Coordenadores do Programa Prof^a. Dr^a. Jaisa Fernandes Soares e Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi, aos quais reservo carinho profundo.

Aos membros da banca examinadora da qualificação: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques e Prof^a. Dr^a. Ana Luisa Lacava Lordello, agradeço as sugestões e o encaminhamento dado à conclusão da pesquisa e, também, ao Prof. Dr. Ronilson Vasconcelos Barbosa, que prontamente aceitou o convite, mesmo com os desafios impostos pelo prazo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelos ensinamentos, pela prática experiente e pela oportunidade de utilização dos ambientes e manuseio dos equipamentos.

Aos fraternos companheiros de labuta, sempre dedicados ao fortalecimento da amizade, meus verdadeiros parceiros de laboratório: Alexandre Augusto de Oliveira, Claudenize Pontes da Silva Leal; Elisa Peres; Janaina Packer; Mauricio Lacerda Belem; Patrícia Zancanella, responsáveis por tornarem meus momentos mais difíceis, em momentos suportáveis, trazendo alegria para minha rotina e oportunizando confraternização contínua para nossa convivência.

Ao Lacen, em especial a Daniel Altino de Jesus, por seu conhecimento, disponibilidade e auxílio, sem o qual certamente não teria concluído os experimentos.

Ao amigo ouvinte Emmanoel Vilaça Costa.

Aos companheiros de viagem e de moradia, irmão Julio Cesar Stiirmer e amigo Anderson Geraldo Marenda Pukasiewicz, que, juntamente com os nobres companheiros, Guber Guerrero e Natan Marcondes Monteiro Osório, tornaram mais fáceis minha permanência, no curso, pela alegria e descontração nas frequentes reuniões e pela compreensão demonstrada quando o momento exigia.

EPÍGRAFE

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

(Aristóteles)

RESUMO

À *Ilex paraguariensis* (Saint Hilaire), conhecida como mate, planta originária da América do Sul, comumente mais consumida como chimarrão, são atribuídas propriedades terapêuticas e algumas atividades farmacológicas, resultado do alto conteúdo de derivados do cafeoilquínico e de flavonóides existentes em suas folhas. Este projeto de pesquisa teve por objetivos executar procedimentos experimentais para isolar, identificar e quantificar os isômeros dos ácidos cafeoil e dicafeoilquínicos da erva mate, além de determinar o conteúdo de cafeicos totais e fenólicos totais, bem como do potencial antioxidante de diferentes amostras de erva mate. Excelentes resultados foram alcançados no isolamento do ácido 3-*O*-cafeoilquínico em SephadexTM. A concentração média deste ácido, obtida por CLAE-EM/EM, em amostras de folhas verdes secas, erva mate comercial, folhas tostadas e borra do chá mate foi, para cada 100 gramas de amostra, de 1838,53 mg; 1482,91 mg; 438,19 mg e 228,77 mg, respectivamente. Para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico os teores, para cada 100 gramas de amostra, foram de 4756,33 mg; 4070,79 mg; 3403,05 mg e 1162,15 mg, para a mesma sequência de amostras. Foram os melhores resultados registrados para o ácido clorogênico, influenciados pelo desenvolvimento de metodologia eficiente para a extração através de um planejamento fatorial. O conteúdo de fenólicos totais seguiu procedimento de Folin-Ciocalteu e o potencial antioxidante foi avaliado pelo 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH. As folhas verdes secas indicaram o maior conteúdo em fenólicos totais, para cada 100 gramas de amostra, com 8,7364 g de ácido cafeico, acompanhadas pela erva mate comercial, com 7,7261 g ácido cafeico para a mesma massa de amostra; porém, as amostras de folhas tostadas e a borra do chá mate acusaram o melhor potencial antioxidante, com IC₅₀ de 7,39 µg eq de ácido cafeico/mL e 12,41 µg eq de ácido cafeico/mL, respectivamente. A avaliação das amostras de erva mate revelou, ainda, a presença da γ -lactona bicíclica do ácido quínico, a quinida, nas folhas verdes da planta, chegando a 2,87 mg/100g de amostra na folha verde desidratada e 1,80 mg/100g de amostra para folhas verdes.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis* (Saint Hilaire). Ácido quínico e derivados antioxidantes. Quinida. CLAE-EM/EM. Fenólicos totais. Potencial antioxidante.

ABSTRACT

To *Ilex paraguariensis* (Saint Hilaire), plant from South América, commonly known as chimarrão, are attributed therapeutical properties and some pharmacological activities, result from high content of derived from caffeoylquinic and flavonoids. This research aimed to undertake experimental procedures to isolate and quantify isomers from caffeoylquinic and dicaffeoylquinic acids present in mate, and determine the content of total caffeic and total phenolics, as well as the antioxidant potential of the differents samples of mate. Excellent results were obtained by isolating of 3-O-caffeoylquinic acid in SephadexTM and its quantification by HPLC-MS/MS, in samples obtained in different phasis of industrial production presented levels of 1838,53 mg; 1482,91 mg; 438,19 mg and 228,77 mg respectively for each 100 g for samples of dry leaves, commercial mate, tosted leaves and borra of mate tea. For 5-O-caffeoylquinic acid these levels were 4756,33 mg; 4070,79 mg; 3403,05 mg and 1162,15 mg for each 100 g for the same sample sequence. These were the best registered results for chlorogenic acid, influenced by the development of an efficient methodology for extraction by a fatorial planning. The contents with total phenolics, following a Folin-Ciocalteu procedure and an antioxidante potencial, with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - DPPH, were also determined. Green dry leaves showed a higher content in total phenolics, 8,7364 g caffeic acid /100g, followed by commercial mate 7,7261; however, the tosted leaves samples and the tea mate sludge presented a better antioxidant potencial, with IC₅₀ de 7,39 e 12,41 µg eq of caffeic acid /mL, respectively. The samples evaluation of erva mate revealed the presence of γ- lactone biciclic of quinic acid, quinide, in the green leaves of the plant, reaching 2,87 mg/100g in dehidrated green leave and 1,80 mg/100g for green leaves.

Key words: *Ilex paraguariensis* (Saint Hilaire). Quinic acid and antioxidants derivatives. Quinide. HPLC-ESI/MS. Total phenolics. Antioxidant potential.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - ESTRUTURA DAS XANTINAS CAFEÍNA, TEOBROMINA E TEOFILINA.....	26
FIGURA 02 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO.....	26
FIGURA 03 - ESTRUTURA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS LINALOL, α -TERPINEOL E ÓXIDO DE TRANS-LINALOL.....	27
FIGURA 04 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS E HIDROXICINÂMICOS	29
FIGURA 05 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS.....	31
FIGURA 06 - ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES RUTINA, CANFEROL E QUERCETINA	32
FIGURA 07 - PRINCIPAIS FONTES DE RADICAIS LIVRES NO CORPO E SEUS CONSEQUENTES DANOS	35
FIGURA 08 - MECANISMO DE REAÇÃO DO REAGENTE 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA (DPPH) COM ANTIOXIDANTE	36
FIGURA 09 - ESQUEMA DAS ETAPAS DE ANÁLISE EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	38
FIGURA 10 - ESQUEMA DA IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY.....	40
FIGURA 11 - EFEITO DO GÁS NEBULIZADOR SOBRE AS GOTÍCULAS DA SOLUÇÃO EM ANÁLISE.....	40
FIGURA 12 - SISTEMA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS TRIPLOQUADRUPOLO API 4000 TM EQUIPADO COM FONTE DE <i>ELECTROSPRAY</i> (ESI/EM/EM).....	43
FIGURA 13 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRATERMELHO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO EM KBr.....	70
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO ÁCIDO CLOROGÊNICO	71
FIGURA 15 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,25 PPM E 7,75 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO ÁCIDO CLOROGÊNICO	72

FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ÁCIDO CLOROGÊNICO	73
FIGURA 17- AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,75PPM E 7,08PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO CAFEICO	76
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ÁCIDO CAFEICO.....	77
FIGURA 19 - CROMATOGRAMAS DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO ISOLADOS DA AMOSTRA DE ERVA MATE	79
FIGURA 20 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO ÁCIDO CLOROGÊNICO PADRÃO E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NA AMOSTRA DE ERVA-MATE	80
FIGURA 21 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO EM KBr	82
FIGURA 22 - ESPECTRO DE MASSAS (EM1), NO MODO NEGATIVO PARA O ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO.....	83
FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSAS (EM2), MODO NEGATIVO, DO ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO.....	83
FIGURA 24 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO.....	84
FIGURA 25 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO EM KBr.....	86
FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA MISTURA DE ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS	87
FIGURA 27 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,20 PPM E 6,45 PPM DA MISTURA DE ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS.....	88
FIGURA 28 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,72 PPM E 7,15 PPM DA MISTURA DE ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS.....	89
FIGURA 29 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 7,40 PPM E 7,70 PPM DA MISTURA DE ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS.....	90
FIGURA 30 - ESPECTRO DE MASSAS (EM1), EM MODO NEGATIVO, DA MISTURA DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO.....	91

FIGURA 31 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA OS ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO	92
FIGURA 32 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DA QUINIDA	93
FIGURA 33 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO QUÍNICO EM KBr	95
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO QUÍNICO	96
FIGURA 35 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 1,80 PPM E 2,18 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO QUÍNICO	97
FIGURA 36 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 3,97 PPM E 4,16 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO QUÍNICO	98
FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ÁCIDO QUÍNICO	99
FIGURA 38 - ESPECTRO DE MASSAS (EM1), EM MODO NEGATIVO, DO PADRÃO DO ÁCIDO QUÍNICO	100
FIGURA 39 - ESPECTRO DE MASSAS (EM2), EM MODO NEGATIVO, DO PADRÃO DO ÁCIDO QUÍNICO	101
FIGURA 40 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ÁCIDO QUÍNICO	102
FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA	103
FIGURA 42 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 1,85 PPM E 2,08 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA	104
FIGURA 43 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 2,20 PPM E 2,52 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA	105
FIGURA 44 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 3,67 PPM E 4,05 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA	106
FIGURA 45 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 4,68 PPM E 4,78 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA	107
FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA QUINIDA	108
FIGURA 47 - ESPECTRO DE MASSAS (EM1), EM MODO NEGATIVO, DA QUINIDA	110

FIGURA 48 - ESPECTRO DE MASSAS (EM2), EM MODO NEGATIVO, DA QUINIDA	110
FIGURA 49 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA A QUINIDA.....	111
FIGURA 50 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE FOLHAS VERDES DA ERVA MATE	112
FIGURA 51 - CROMATOGRAMA OBTIDO NO MODO <i>FULL SCAN</i> DA QUINIDA, DE UMA AMOSTRA DE FOLHAS VERDES DA ERVA MATE, EVIDENCIADO PELOS FRAGMENTOS DE m/z 67,0 E m/z 92,9 DA QUINIDA.....	113
FIGURA 52 - ESQUEMA POSTULADO PARA A REAÇÃO DE PIRÓLISE DO ÁCIDO CLOROGÊNICO	115
FIGURA 53 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS PRINCIPAIS PARA A EXTRAÇÃO DE ÁCIDO QUÍNICO DE AMOSTRA DE ERVA MATE.....	117
FIGURA 54 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO ENTRE DUAS VARIÁVEIS PARA A EXTRAÇÃO DE ÁCIDO QUÍNICO DE AMOSTRA DE MATE	118
FIGURA 55 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS PRINCIPAIS PARA O ÁCIDO CAFEICO	121
FIGURA 56 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO ENTRE DUAS VARIÁVEIS PARA O ÁCIDO CAFEICO.....	122
FIGURA 57 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS PRINCIPAIS PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	125
FIGURA 58 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO ENTRE DUAS VARIÁVEIS PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO	126
FIGURA 59 - ESPECTROS DE MASSAS (EM1) DO PADRÃO DE ÁCIDO CAFEICO: A – MODO POSITIVO; B – MODO NEGATIVO	130
FIGURA 60 - CROMATOGRAMA DA HIDRÓLISE ALCALINA NA PRESENÇA DE EDTA-ASCORBATO DA AMOSTRA DE FOLHA VERDE SECA DA ERVA MATE	138

FIGURA 61 - CURVAS EXPONENCIAIS DAS CONCENTRAÇÕES, EM μM , DAS AMOSTRAS DE ERVA E DOS PADRÕES DOS ÁCIDOS CAFEICO E ASCÓRBICO, QUE CAUSAM 50% DA INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH, EM FUNÇÃO DOS ANTILOGARÍTIMOS DAS CONCENTRAÇÕES	145
--	-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRINCIPAIS CLASSES DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS.....	28
TABELA 2 - VARIÁVEIS INDEPENDENTES DE CONTRASTE PARA O PLANEJAMENTO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DA ERVA MATE	58
TABELA 3 - CODIFICAÇÃO E NÍVEIS REAIS DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS DEFINIDAS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{6-1}	59
TABELA 4 - PARÂMETROS SELECIONADOS NA COMPOSIÇÃO DO MÉTODO MRM (EM VOLTS) PARA CADA FRAGMENTO DA QUINIDA, ÁCIDO QUÍNICO, ÁCIDO NEOCLOGÊNICO, ÁCIDO CLOGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E MISTURA DOS ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS	63
TABELA 5 - VOLTAGENS DO <i>SPRAY</i> DE ÍONS (EM VOLTS)	63
TABELA 6 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA A AMOSTRA DO ÁCIDO CLOGÊNICO	74
TABELA 7 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA O ÁCIDO CAFEICO	77
TABELA 8 - DADOS DE RMN DE ^1H PARA OS ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO	91
TABELA 9 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA O ÁCIDO QUÍNICO.....	100
TABELA 10 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA A QUINIDA.....	109
TABELA 11 - COMBINAÇÃO DOS FATORES QUE MELHOR EXTRAEM OS ÁCIDOS QUÍNICO, CAFEICO E CLOGÊNCIO DAS AMOSTRAS DE ERVA MATE.....	128
TABELA 12 - MASSAS MOLECULARES, NO MODO NEGATIVO, DOS COMPOSTOS EM ANÁLISE ACRESCIDAS EM 1DA	129
TABELA 13 - ALGUNS DOS FRAGMENTOS ESI-EM/EM DOS COMPOSTOS AVALIADOS NOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS DE ERVA MATE.....	131

TABELA 14 – EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR PARA OS ANALITOS.....	131
TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES (MG/100G DE AMOSTRA) DA QUINIDA E DOS ÁCIDOS QUÍNICO, CAFEICO, CLOROGÊNICO E NEOCLOROGÊNICO, NAS AMOSTRAS DE ERVA MATE	132
TABELA 16 - DADOS COMPARATIVOS DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO (CHA), NEOCLOROGÊNICO (NEOCHA) E CAFEICO EM AMOSTRAS DE ERVA MATE.....	132
TABELA 17 - CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CAFEICO NAS AMOSTRAS DE ERVA MATE HIDROLISADAS NA AUSÊNCIA (HIDRÓLISE 1) E NA PRESENÇA DE EDTA 10MMOL L ⁻¹ E ÁCIDO ASCÓRBICO 1% (HIDRÓLISE 2).	137
TABELA 18 - PERCENTUAIS MÉDIOS DE RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO NA HIDROLISE DO BRANCO.....	140
TABELA 19 - CONTEÚDO DOS FENÓLICOS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE ERVA MATE	141
TABELA 20 - ATIVIDADE CAPTADORA DO RADICAL DPPH (IC ₅₀).....	144

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO QUÍNICO DE AMOSTRA DE MATE	119
GRÁFICO 2 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO DE AMOSTRA DE MATE	123
GRÁFICO 3 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO DE AMOSTRA DE MATE	127
GRÁFICO 4- CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO CAFEICO DETERMINADAS VIA CLAE-EM/EM, NAS AMOSTRAS NORMAIS E AMOSTRAS SUBMETIDAS À HIDRÓLISE, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE EDTA-ASCORBATO	139
GRÁFICO 5 - PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH PARA OS PADRÕES DO ÁCIDO CAFEICO E ÁCIDO ASCÓRBICO PARA AS AMOSTRAS DE ERVA MATE, EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS E PADRÕES	143
GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS AJUSTES DA FUNÇÃO CONCENTRAÇÃO X PERCENTAGEM INIBITÓRIA POR REGRESSÃO LINEAR E EXPONENCIAL.....	146
GRÁFICO 7 - CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS DE ERVA E DO PADRÃO DO ÁCIDO CAFEICO, QUE CAUSAM 50% DA INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH	147
GRÁFICO 8 - CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS CAFEICO, NEOCLOROGÊNICO, CLOROGÊNICO E CAFEICOS TOTAIS PARA AS AMOSTRAS DE ERVA MATE.....	149
GRÁFICO 9 - AVALIAÇÃO DO PERFIL QUANTITATIVO DAS CONCENTRAÇÕES NORMALIZADAS DOS ÁCIDOS CAFEICO, NEOCLOROGÊNICO, CLOROGÊNICO E CAFEICOS TOTAIS, PARA AS AMOSTRAS DE ERVA MATE.....	150

LISTA DE SIGLAS

ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BCM	-	Borra do Chá Mate (amostra)
CAD	-	Gás de Colisão
CCD	-	Cromatografia em Camada Delgada
CCDC	-	Cromatografia em Camada Delgada Centrífuga
CEM	-	Canal Multiplicador de Elétrons
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrômetro de Massa.
CLAE-EM/EM	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrômetro de Massas Triploquadrupolo
CLAE-FR	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CLAE-UV	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultra-violeta
CLV	-	Cromatografia Líquida à Vácuo.
CONAMATE	-	Comissão Nacional da Cadeia Produtiva da Erva Mate
Cps	-	Contagem por segundos
CUR	-	Cortina de Gás
CV	-	Coeficiente de Variação
CXP	-	Potencial de Saída da Cella de Colisão
DEPT	-	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DP	-	Potencial de Desaglomeração
DPPH	-	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
DPR	-	Desvio Padrão Relativo
EDTA	-	Etileno di-amin tetra-acético
EFS	-	Extração em Fase Sólida
EM	-	Espectrometria de Massas
EM1	-	Espectrometria de Massas simples quadrupolo

EM2	-	Espectrometria de Massas triplo quadrupolo
EMC	-	Erva Mate Comercial (amostra)
EMIE	-	Espectrometria de Massas Impacto Eletrônico
EP	-	Potencial de Entrada
ESI	-	Ionização por <i>electrospray</i>
ESI-MS	-	<i>Electrospray Ionization/Mass Spectrometry</i>
FIA	-	Injeção de Fluxo
FP	-	Potencial de Focalização
FT	-	Folhas Tostadas (amostra de erva mate)
FV	-	Folhas Verdes (amostra de erva mate)
FVD	-	Folhas Verdes Desidratadas (amostra de erva mate)
FVS	-	Folhas Verdes Secas (amostra de erva mate)
HPLC	-	<i>High performance liquid chromatography</i>
IS	-	Spray de Íons
I.V.	-	Infra Vermelho
LACEN	-	Laboratório Central do Estado
LDE	-	Limite de Detecção do Equipamento
LDM	-	Limite de Detecção do Método
LMR	-	Limite Máximo de Resíduos
LQE	-	Limite de Quantificação do Equipamento
LQM	-	Limite de Quantificação do Método
MRC	-	Material de Referência Certificado
MRM	-	Múltipla Reação Monitorada
NEB	-	Gás Nebulizador
NP	-	Difenilboriloxietilamina
PEG	-	Polietileno Glicol-4000
PMODS	-	Polimetiloctadecil-siloxano
PMOS	-	Polimetiloctil-siloxano
ppb	-	Parte por bilhão
ppm	-	Parte por milhão
ppt	-	Parte por trilhão
RMN 13C	-	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN 1H	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	-	Rotações por minuto
TMS	-	Tetrametilsilano
u.m.a	-	Unidade de massa atômica

LISTA DE ABREVIATURAS

d	-	dupleteo
Da	-	Dalton
Hz	-	hertz
m	-	multipleto
min.	-	minutos
q	-	quarteto
R	-	recuperação
Rf	-	fator de retenção
s/n	-	sinal/ruído
s	-	singleto
t	-	tripleto
v/v	-	volume/ volume
V	-	Volts

LISTA DE SÍMBOLOS

C18	-	Coluna de sílica com fase reversa de polimetiloctadecil-siloxano
C8	-	Coluna de sílica com fase reversa de polimetiloctil-siloxano
δ	-	Deslocamento químico
$\lambda_{\text{máx}}$	-	Comprimento de onda (nm) de absorção máxima
μA	-	Micro Amperes
Å	-	Angström
mol/L	-	Unidade de concentração de solução expressa em quantidade de matéria por litro
m/z	-	Relação massa/carga
m Ω	-	miliOhm
N	-	Unidade de concentração de solução expressa em equivalentes-grama por litro
®	-	Marca registrada no Brasil
TM	-	Marca registrada nos Estados Unidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	A PLANTA <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	24
2.2	ERVA MATE NO CONTEXTO HISTÓRICO DO BRASIL E SUA IMPORTÂNCIA COMERCIAL	24
2.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA MATE	26
2.4	COMPOSTOS FENÓLICOS E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	33
2.5	USO DE CLAE-EM/EM PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA	37
3	OBJETIVOS	44
3.1	GERAIS	44
3.2	ESPECÍFICOS	44
4	EXPERIMENTAL	46
4.1	ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	46
4.1.1	UTILIZADOS EM CROMATOGRAFIA	46
4.1.2	UTILIZADOS EM ESPECTROMETRIA	47
4.1.3	DE UTILIZAÇÃO VARIADA	48
4.2	PREPARAÇÃO DA SÍLICA EM FASE REVERSA	49
4.3	PREPARO DA SEPHADEX™ LH-20	50
4.4	AMOSTRAS	50
4.4.1	PREPARO DA AMOSTRA DE ERVA MATE NA INDÚSTRIA	50
4.4.2	ESPECIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	51

4.5	OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES.....	52
4.5.1	ISOLAMENTO DO ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO E DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO DO EXTRATO BRUTO DE ERVA MATE	52
4.5.2	ISOLAMENTO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DOS GRÃOS DE CAFÉ.....	54
4.5.3	OBTENÇÃO DA QUINIDA	56
4.6	QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS	57
4.6.1	PLANEJAMENTO FATORIAL PARA AVALIAÇÃO DOS FATORES DE INFLUÊNCIA SOBRE A EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS DA ERVA MATE	57
4.6.2	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO TOTAL	60
4.6.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE IONIZAÇÃO DOS METABÓLITOS POR CLAE- EM/EM	61
4.6.4	MÉTODO DE ANÁLISE – MODO MRM – MÚLTIPLA REAÇÃO MONITORADA	62
4.6.5	CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	64
4.7	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	65
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DOS EXTRATOS.....	68
5.1.1	ISOLAMENTO DOS EXTRATOS EM SÍLICA DE FASE REVERSA.....	69
5.1.1.1	Amostra: grãos verdes do café.....	69
5.1.1.2	Amostra: erva mate comercial.....	78
5.1.2	FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM SEPHADEX TM	80
5.2	OBTENÇÃO DA QUINIDA.....	92
5.2.1	REAÇÃO DE OBTENÇÃO DA QUINIDA.....	93
5.2.2	IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO QUÍNICO	94

5.2.3 IDENTIFICAÇÃO DA QUINIDA	102
5.2.4 QUINIDA NAS FOLHAS VERDES DE ERVA MATE.....	111
5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO.....	116
5.3.1 ÁCIDO QUÍNICO	116
5.3.2 ÁCIDO CAFEICO.....	121
5.3.3 ÁCIDO CLOROGÊNICO	124
5.4 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	128
5.5 ÁCIDO CAFEICO TOTAL.....	136
5.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	140
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	142
6 CONCLUSÕES.....	151
7 REFERÊNCIAS	152
APÊNDICES	162

1 INTRODUÇÃO

Quando se trata de investigar as características de uma planta, inúmeras possibilidades são oferecidas como linhas de pesquisa: melhoramento genético, aspectos morfológicos, influências do meio para seu desenvolvimento, rotas biosintéticas de metabólitos, constituição molecular de suas partes, benefícios ou malefícios ao consumo, desenvolvimento de produtos, além de muitas outras. Cada uma destas linhas é sempre acompanhada por grandes desafios, alcançados durante o desenvolvimento da pesquisa, mas certamente todas carregam o mérito de descobertas inovadoras, muitas vezes compartilhadas com as demais áreas, influenciando também seus resultados e permitindo o desenvolvimento científico.

Com a erva mate (*Ilex paraguariensis*) não é diferente. Muitos anos de intensa pesquisa globalizada, envolvendo os mais variados aspectos de interesse, permitiram a esta planta ocupar posição de destaque no rol de importância. Sua exploração extrativista marcou época no desenvolvimento econômico de nossa região, seu elevado consumo ainda define padrões típicos de comportamento e suas propriedades organolépticas e terapêuticas estimulam a inovação de produtos.

Uma infinidade de moléculas ocupam suas raízes, troncos, galhos e folhas e, levando-se em consideração que para o consumo humano folhas e talos são permitidos à erva comercializada como mate, cabe restringir a pesquisa sobre os constituintes da planta especificamente a essas partes. A estratégia de isolar alguns de seus constituintes de interesse químico, fracionados a partir de uma matriz extremamente complexa que é o vegetal, possibilita seu uso como padrão nas demais investigações.

Para que se tenham garantias sobre a identidade das moléculas isoladas e purificadas, métodos instrumentais permitem o reconhecimento de detalhes mínimos nas respostas analíticas, facilitando a elucidação de suas estruturas.

Para definir seus teores, inclusive em diferentes etapas do processamento desta planta, a melhor opção é exercer controle sobre os diferentes fatores envolvidos no método de análise, preocupando-se com a influência que manifestam

sobre os outros. Tal planejamento pode garantir resultados mais confiáveis, minimizando custos, insumos e tempo de análise.

A partir do exposto definem-se os parâmetros iniciais desta pesquisa, que propõe isolar, do grupo de constituintes fenólicos da erva mate, as moléculas de ácido clorogênico, neoclorogênico e dos dicafeoil químicos, além de sintetizar a quinida, preocupando-se em confirmar suas estruturas por meio de infra-vermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Em seguida, executar um planejamento fatorial para estimar as melhores condições de extração desses compostos da amostra e utilizá-los como padrão de referência na determinação de seus teores em amostras *in natura* (folhas verdes), processadas (folhas verdes secas e erva mate comercial) bem como no resíduo industrial do chá mate (borra do chá mate); aproveitando a disponibilidade do ácido cafeico e do ácido quínico como padrões comerciais, para ampliar a gama de produtos investigados. Como método inovador na quantificação, foram adotadas as intensidades geradas pelos fragmentos obtidos destes compostos em espectrômetro de massas com interface *electrospray* e acoplado à cromatógrafo líquido de alta eficiência.

As dificuldades impostas durante o desenvolvimento dos experimentos, possibilitaram ajustes, como a utilização dos grãos de café como opção para extração de um dos padrões, oportunizando contribuições relevantes ao tema.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PLANTA *Ilex paraguariensis*

A *Ilex paraguariensis* (Saint Hilaire), conhecida como mate, é uma planta originária da América do Sul. Seu consumo mais comum se faz através do chimarrão, uma adaptação popular da bebida tônica consumida pelos nativos da região, os guaranis, mantida por centenas de anos. A plantação da erva mate era estimulada pelos Jesuítas, com produção comercializada na Europa, onde ficou conhecida como “chá dos Jesuítas”, “chá Paraguaio” ou “chá mate”. Esse comércio foi o incentivo econômico para as missões no Paraguai, nordeste da Argentina e no Rio Grande do Sul (LUNCEFORD, 2005).

O caule deesa planta tem cor acinzentada, com média 30 cm de diâmetro. De porte variável, pode atingir doze metros de altura, mas se podada não passa dos sete metros (CAMPUS, 2007). A parte usada é a foliar, cujo consumo é feito de formas variadas, definidas conforme a região: chimarrão, chá quente, chá gelado e o tereré, versão tropical do chimarrão, servido com gelo e limão.

A esta espécie, em especial, são atribuídas propriedades terapêuticas e algumas atividades farmacológicas são descritas como resultado do alto conteúdo de derivados dos cafeoilquínicos e dos flavonóides existentes em suas folhas (FILIP, 2001).

2.2 ERVA MATE NO CONTEXTO HISTÓRICO DO BRASIL E SUA IMPORTÂNCIA COMERCIAL

A partir de 1610, iniciou-se com os jesuítas a implementação do plantio da erva mate para sua comercialização na Europa. Os bandeirantes difundiram seu

consumo entre os portugueses e a Resolução Régia de 1722 permitiu o comércio de erva mate entre os colonizadores do sul com os espanhóis das Províncias de Buenos Aires e de Sacramento (MAZUCHOWSKI, 2000^b).

Durante o século XIX e início do século XX, foi determinante a conexão comercial da erva mate com o gado e a madeira que, atrelada aos ciclos econômicos e ao sistema de transporte, denominado de tropeirismo, demonstraram o potencial econômico da erva mate, tornando cidades prósperas, fortalecendo o comércio e monopolizando trabalho e capital. Sua influência social e econômica foi tão expressiva que a ela é atribuída a emancipação política do Paraná da Província de São Paulo, em 1853 (MAZUCHOWSKI, 2000^a).

Ao final do século XX, deu-se um novo aumento no consumo da erva mate, sob a forma de novos produtos. A maior demanda, observada nos últimos 20 anos, fez com que indústrias surgissem, gerando novos empregos. A atividade se fez presente em cerca de 180 municípios do Estado do Paraná, com mais de 200 empresas e 200 mil postos de trabalho (RUCKER, 1996). A probabilidade do incremento de seu uso em produtos comerciais, principalmente em bebidas energéticas é elevada, mas seu principal consumo ainda ocorre pela infusão de folhas verdes moídas (SALDAÑA *et al.*, 1999).

É possível afirmar que muito mais ainda poderia ser consumido, pois competindo com o café e os refrigerantes, o mate detém uma pequena parcela do mercado. Deste fato decorre o interesse primordial das diversas entidades e instituições envolvidas com a cadeia produtiva da erva mate em identificar e promover o seu desenvolvimento tecnológico (MAZUCHOWSKI, 2000^a).

A erva mate pode ser estudada sob aspectos químico-bromatológicos ou como matéria-prima para vários subprodutos (VALDUGA, 1995). Com fins alimentares, seu consumo pode estar associado ao uso como alimento em produtos tradicionais e novos produtos, sendo nestes um ponto favorável ao seu consumo, entre outros fatores, a sua composição química (CIRIO e RÜCKER, 2000). Como fatores preponderantes para a elaboração de novos produtos, focam-se as funções fisiológicas, contribuindo para a manutenção e melhoria da saúde (YOSHIMOTO *et al.*, 2005).

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA MATE

A erva mate contém xantinas, saponinas, compostos fenólicos, amino ácidos, minerais e vitaminas (HECK e DE MEJIA, 2007).

As xantinas, uma classe dos alcalóides purina, também são encontradas no chá, café e chocolate. Na erva mate, a teofilina, a teobromina e a cafeína (FIGURA 01) estão em maior concentração nas folhas. A cafeína é a que atua mais intensamente sobre o sistema nervoso central e sobre o metabolismo basal, além de aumentar a produção de suco gástrico (BASTOS, 2006).

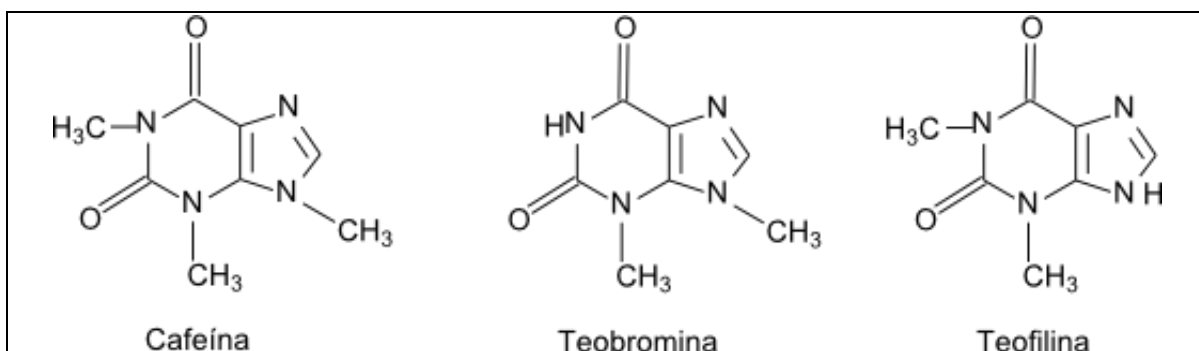


FIGURA 1 - ESTRUTURA DAS XANTINAS CAFEÍNA, TEOBROMINA E TEOFILINA

FONTE: Modificado pelo autor (2008)

As saponinas triterpênicas, derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (FIGURA 02), são responsáveis tanto pela formação de espuma, aroma e sabor amargo do mate, quanto pelas propriedades antiinflamatórias e hipocolesterolêmicas (GNOATTO, 2005).

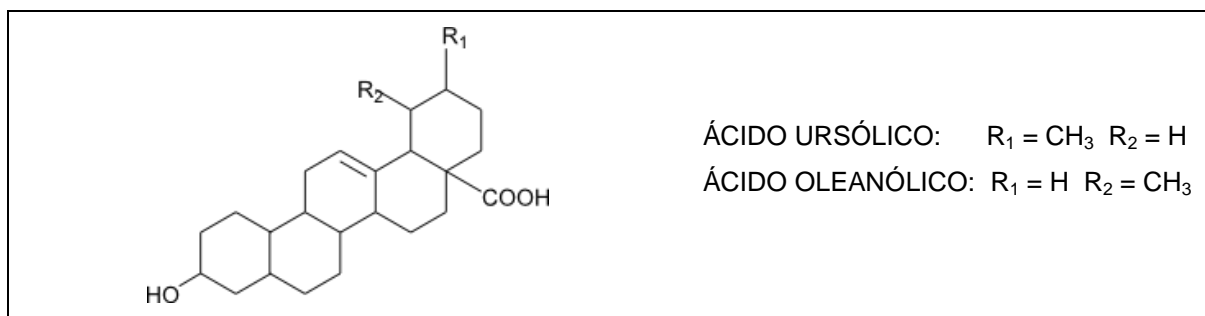


FIGURA 2 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO

FONTE: Modificada pelo autor de VECHIA, GNOATTO e GOSMANN (Submetido à publicação, 2008)

Entre os compostos voláteis, Machado *et al.* (2007) conseguiram identificar, linalol, α -terpineol e óxido de trans-linalol (FIGURA 03), abrangendo 69% dos compostos detectados. Maiores teores de linalol e seus óxidos implicam em chás mais aromáticos. Estudos como este contribuem para o desenvolvimento de variedades, práticas agronômicas e processamento da erva mate, visando padronização da qualidade e agregação de maior valor aos produtos.

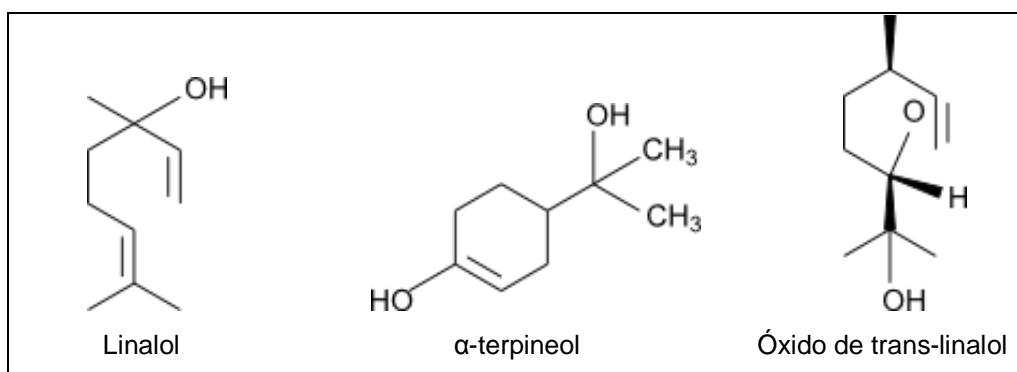


FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS LINALOL, α -TERPINEOL E ÓXIDO DE TRANS-LINALOL

FONTE: Modificada pelo autor de SAMPAIO (2008)

Exercendo grande influência na qualidade da erva mate estão os compostos fenólicos. Estes se desenvolvem normalmente na planta, ou em resposta às condições de estresse, como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta, entre outros (NACZK, 2004). Os compostos fenólicos são definidos por Heck e De Mejia (2007) como “uma classe especial de compostos orgânicos contendo um anel benzênico ligado a um ou mais grupos hidroxila (OH^-)”, ao mesmo tempo em que são caracterizados erroneamente por alguns pesquisadores como “polifenólicos”; um termo inadequado para representar um grupo no qual nem todos são derivados poli hidroxilados (ROBARDS *et al.*, 1999). Cerca de 8000 metabólitos naturais são referenciados simplesmente com o termo fenólicos (ROBBINS, 2003).

Os compostos mais comuns de fonte natural, como antioxidantes fenólicos, são os ácidos fenólicos, os flavonóides, os taninos e os tocoferóis (KING E YOUNG, 1999).

Na (TABELA 1) está indicada uma classificação elaborada através do número constitutivo de átomos de carbono na conjugação, associada à estrutura básica do esqueleto do fenol, conveniente por auxiliar na distinção dos grupos de compostos fenólicos nas plantas e revelar suas estruturas (ROBARDS *et al.*, 1999; ANTOLOVICH *et al.*, 2000).

TABELA 1: PRINCIPAIS CLASSES DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS

CLASSE	ESQUELETO BÁSICO
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6 - C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6 - C_3$
Nafitoquinonas	$C_6 - C_4$
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

FONTE: ANGELO e JORGE (2007)

Os compostos fenólicos podem ser classificados quimicamente em três amplas categorias: fenólicos simples, polifenóis e um grupo variado. Os fenóis simples consistem principalmente de ácidos fenólicos (ácido cinâmico e derivados de ácido benzóico); os polifenóis são subdivididos em duas classes principais: taninos e flavonóides e grupo variado é composto por outros compostos de natureza fenólica tais como cumarinas e estilbenos (LUTHIRA, 2006)

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem um anel aromático, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos, quanto para o organismo (FILIP *et al.*, 2000). Essas substâncias formam um dos muitos grupos de metabólitos secundários que incluem uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, largamente distribuídos no reino vegetal e nos microorganismos, também fazendo parte também do metabolismo animal. Os

vegetais e a maioria dos microorganismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico e, principalmente, a partir dele, os compostos fenólicos. Essa capacidade não é permitida aos animais. (CARVALHO, GOSMANN e SCENKEL; citado por SIMÕES *et al.*, org., 1999). Esses ácidos são divididos em dois grupos (FIGURA 04): o primeiro, composto pelos derivados do ácido hidróxibenzóico, com sete átomos de carbono (C₆-C₁), caracterizados como os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, que inclui os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico; o segundo, formado pelos derivados do ácido hidroxicinâmico, que possuem nove átomos de carbono (C₆-C₃), cujos representantes mais comuns são os ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (BRAVO, 1998).

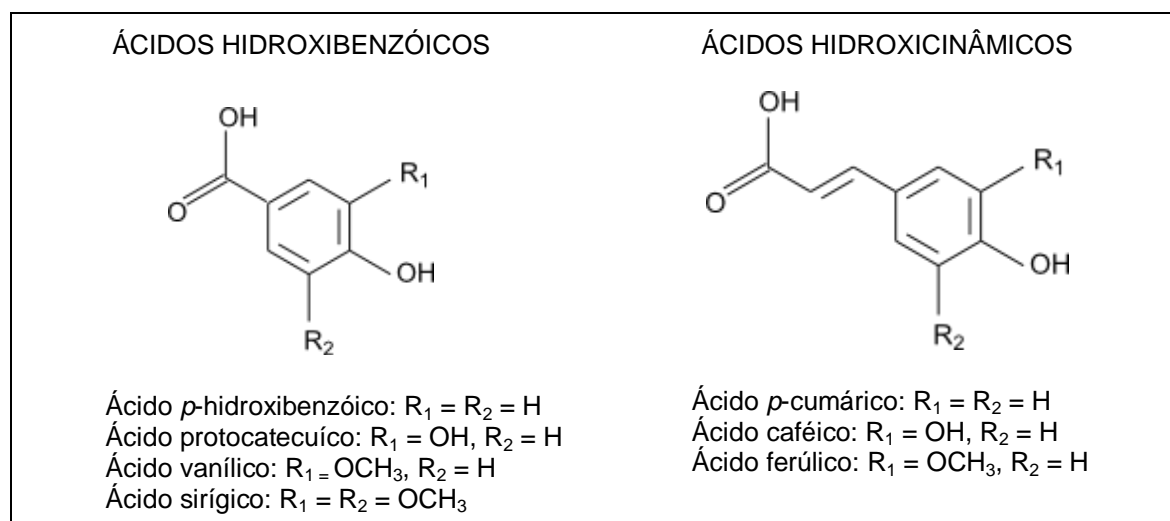


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS E HIDROXICINÂMICOS
FONTE: ANGELO e JORGE (2007)

Soares (2002) considerava as cumarinas, derivadas do ácido hidroxicinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico, como um terceiro grupo. Afirmar que os ácidos hidroxicinâmicos constituem um dos grupos mais representativos dos ácidos fenólicos não incide em erro, pois uma vez que aparecem livres ou ligados entre si ou com outros compostos, podem ser encontrados em quase todas as plantas (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2000). Seu representante mais comum entre os alimentos é o ácido cafeico, que pode aparecer esterificado com o ácido quínico, formando, por exemplo, o ácido clorogênico.

Outras estruturas são formadas pela esterificação de duas ou até três moléculas do ácido cafeico com o ácido quínico, formando os ácidos di e tricafeoilquínicos, respectivamente.

Clifford (1999) define as formas nas quais os cinamatos ocorrem nos alimentos e bebidas e afirma que os ácidos clorogênicos clássicos são uma família de ésteres formados entre certos ácidos *trans*-cinâmicos e o ácido quínico (ácido 1,3,4,5-tetra-hidroxi-ciclohexanóico), com hidroxilas na posição axial nos carbonos 1 e 3 e equatorial nos carbonos 4 e 5. Durante o processamento, os isômeros *trans* podem parcialmente ser convertidos em *cis*, já detectados em produtos processados, porém, não *in natura*.

Ainda de acordo com Clifford (1999), pela numeração da IUPAC, o ácido clorogênico mais comum é o ácido 5-*O*-cafeoil quínico (5-CQA), sendo o único disponível comercialmente. A subdivisão dos ácidos clorogênicos (CGA) é realizada por meio da identidade do derivado do ácido cinâmico, do número e da posição dos resíduos acila em mono-ésteres do ácido cafeico - ácidos cafeoilquínicos (CQA), ácidos *p*-cumaroilquínicos (*p*CoQA) e ácidos feruloilquínicos (FQA); di e tri-ésteres e um tetra-éster do ácido cafeico – diCQA, triCQA e tetraCQA; di-ésteres misturados dos ácidos cafeico e ferúlico – ácidos ceoilferuloilquínicos (CFQA), ou mistura dos ácidos cafeico e sinápico – ácidos cafeoilsinapoilquínicos (CSiQA) e ésteres misturados envolvendo várias permutações entre um e três resíduos do ácido cafeico com um ou dois resíduos de um ácido dibásico alifático – glutárico, oxálico, succínico (FIGURA 5).

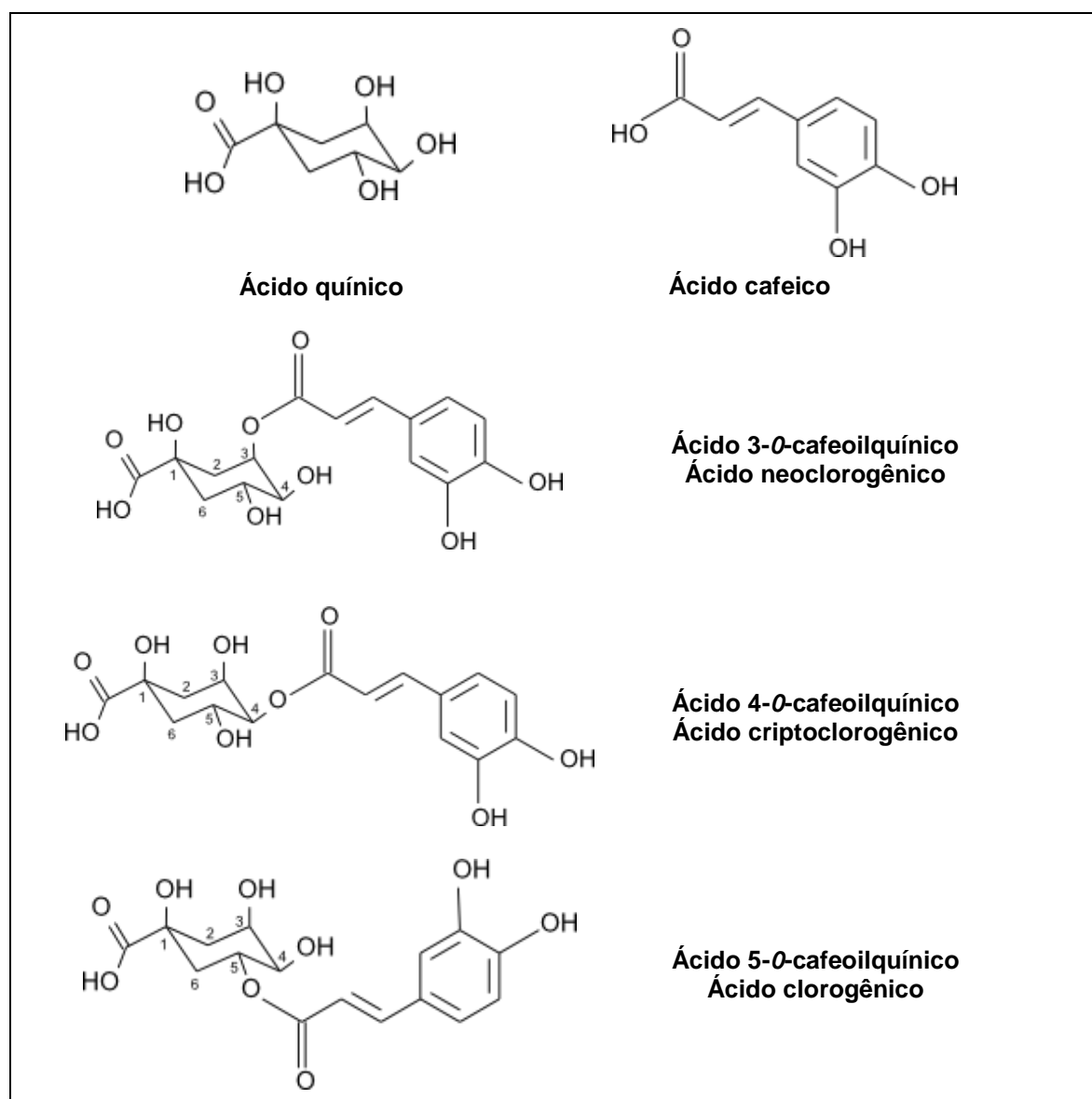


FIGURA 5 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS
FONTE: Modificado pelo autor (2008)

Cabe também salientar que a nomenclatura IUPAC recomenda que a numeração para identificação do representante majoritário da família CGA, como exemplo o 5-CQA, deve seguir a direção na qual exista o maior número de substituintes no anel do ácido quínico. Esta observação faz-se importante porque ainda se encontram em muitos documentos, referências ao ácido clorogênico como se fosse o 3-CQA, principalmente por questões históricas, pré-IUPAC, não sistematizadas pelas normas (DE MARIA e MOREIRA, 2004).

As propriedades farmacológicas dos ácidos cafeoilquínicos são diversas, incluindo em alguns atividade antimicrobial e em outros, propriedades anti-inflamatórias. Ao ácido 5-*O*-cafeoilquínico atribui-se um excelente potencial hepatoprotetor (GILLET, *et al.*, 1999), um amplo reconhecimento pela sua capacidade antioxidante em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nos humanos, além dos seus efeitos antimutagênico e anticarcinogênico (CHUN, 2004).

A presença dos flavonóides rutina, canferol e quercetina (FIGURA 06) (SHUBERT *et al.*, 2006) parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngicas e antibacteriana) e com atração de polinizadores (SANTOS; citado por SIMÕES *et al.*, org., 1999).

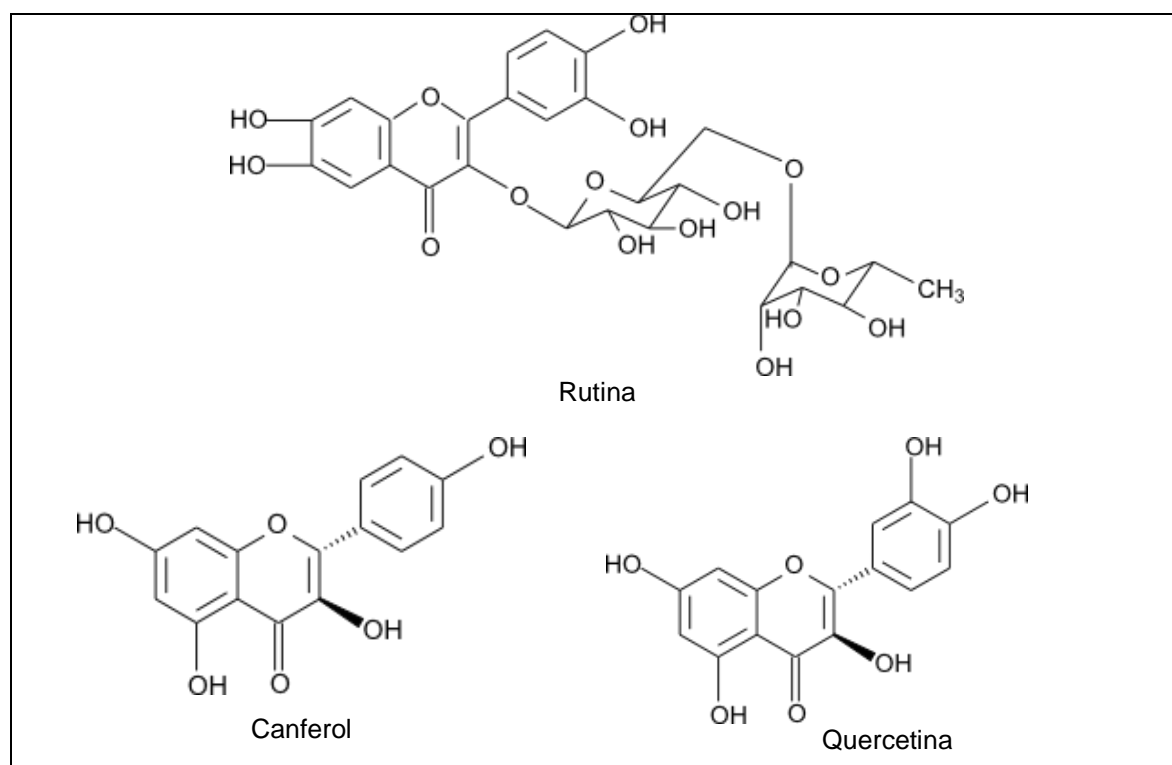


FIGURA 6 - ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES RUTINA, CANFEROL E QUERCETINA

FONTE: Modificada pelo autor de BECHO, MACHADO e GUERRA (Submetido à publicação, 2008)

2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A alta concentração de compostos fenólicos presentes na erva mate, suas importantes funções nutricionais e farmacológicas, além do enorme interesse que despertam, comprovadas pela grande quantidade de estudos realizados até o momento, faz dos compostos fenólicos foco de merecida atenção.

Todas as classes de compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, derivados flavonóides, poliflavanos e outros) estão envolvidas nos mecanismos de resistência da planta, desempenhando um importante papel em seu metabolismo, no seu desenvolvimento, além de protegerem-na contra estresses bióticos (patogêneses e predadores) e abióticos (radiação ultravioleta, seca e outros) (DICKO *et al.*, 2006). Os componentes fenólicos das plantas variam no conteúdo e estrutura – número de anéis fenólicos, substituições aromáticas, glicosilação, conjugação com outros compostos fenólicos ou com ácidos orgânicos – por conseguinte variando também suas propriedades antioxidantes (MAISUTHISAKUL, PONGSAWATMANIT e GORDON, 2007).

Como antioxidante entende-se qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas ao de um substrato oxidável, retarde significativamente ou iniba a oxidação do substrato (YOUNG e WOODSIDE, 2001). Os compostos fenólicos antioxidantes interrompem a propagação da sequência de autooxidação dos radicais livres por contribuírem com um átomo de hidrogênio do grupo hidroxil fenólico, formando um radical livre relativamente estável que não inicia ou propaga processos de oxidação adicionais (KAUR e KAPOOR, *apud*: MAISUTHISAKUL, PONGSAWATMANIT e GORDON, 2007).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1995), o radical livre pode ser definido como qualquer espécie molecular capaz de existência independente que contém um elétron desemparelhado num orbital atômico. Young e Woodside (2001) afirmam que muitos radicais são altamente reativos e podem doar ou retirar um elétron de outras moléculas com um curto período de vida em sistemas biológicos (menos de 10^{-6} segundos).

Os humanos, como todo organismo aeróbico, são dotados de ácidos graxos poli-insaturados facilmente oxidados em reações mediadas por radicais livres. Quando o oxigênio é fornecido em excesso para as células, ou sua redução é insuficiente, são originadas espécies reativas do oxigênio (EROs). Os organismos aeróbicos são protegidos da toxicidade do oxigênio por sistemas naturais de defesa, envolvendo mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (SCHINELLA *et al.*, 2000).

Os antioxidantes enzimáticos mais importantes são a peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase; como não enzimáticos, os flavonóides e os ácidos fenólicos. Quando os sistemas endógenos são inadequados para o propósito de captura completa das espécies reativas do oxigênio (EROs), algumas macromoléculas importantes irão sofrer danos, induzindo patologêses às células e tecidos e influenciando inúmeras doenças, incluindo artrite reumatóide, diabetes mellitus e distúrbios cardiovasculares, inflamações, doenças neurodegenerativas, periodontal e do fígado (ANESINI, FERRARO e FILIP, 2006), visto que as substâncias com propriedades antioxidantes protegem as células contra os danos.

Os radicais livres na maioria dos estados patológicos são os derivados do oxigênio, em especial os superóxidos ($O-O^{\cdot-1}$) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), formados pela adição de um único elétron ao oxigênio (FIGURA 07). Moléculas como adrenalina, nucleotídeos flavina, compostos tiol e glicose, podem oxidar-se na presença do oxigênio e produzir os superóxidos; em processos catalisados pela presença de metais de transição como o cobre e o ferro.

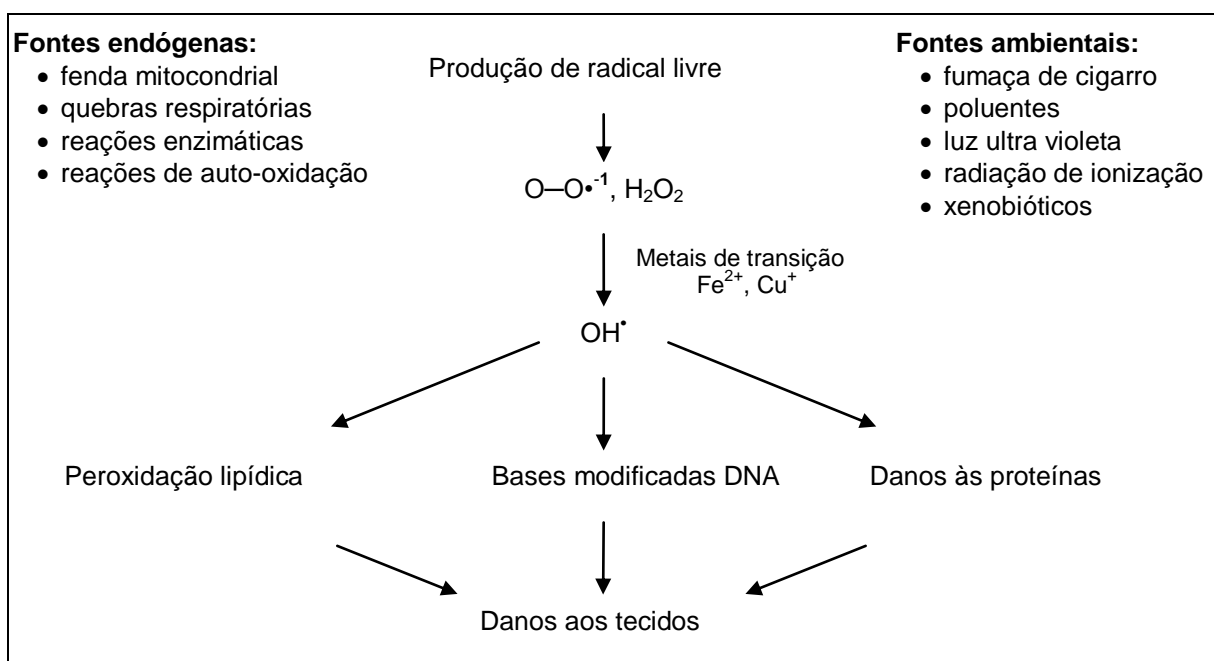


FIGURA 7 - PRINCIPAIS FONTES DE RADICAIS LIVRES NO CORPO E SEUS CONSEQUENTES DANOS

FONTE: YOUNG e WOODSIDE (2001)

O desenvolvimento de compostos antioxidantes sintéticos tem mostrado efeitos mutagênicos, provocando um dano na molécula de DNA não reparado no momento da replicação celular e replicado às gerações seguintes. Esse fato desloca ainda mais a atenção para o estudo dos compostos advindos de fontes naturais, para usos farmacológicos, em alimentos ou suplementos (ANESI, FERRARO e FILIP, 2006). Na indústria de alimentos, principalmente na indústria de óleos e gorduras, os compostos antioxidantes sintéticos mais utilizados são o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxitolueno), PG (propil galato) e TBHQ (terc-butil-hidroquinona), adicionados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica (RAMALHO e JORGE, 2006).

Cientistas clínicos, biomédicos, químicos e de alimentos vêm demonstrando crescente interesse nos compostos antioxidantes e suas atividades. Para tanto, fazem uso de metodologias cada vez mais eficientes na reprodução de sistemas naturais para a avaliação analítica do potencial individual dos compostos fenólicos, ou dos extratos das plantas dos quais são constituintes.

Os métodos analíticos para avaliação da ação antioxidante baseiam-se na identificação de diferentes mecanismos antioxidativos, sob condições variáveis (BECKER, 2004). A atividade antioxidante pode ser avaliada em termos da habilidade da amostra (padrão, chá, extrato) em doar hidrogênios ou capturar radicais usando quimioluminescência do Co(II)/EDTA induzida pelo luminol e o doseamento de radicais livres com 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), reação acompanhada por meio da mudança de cor de violeta ao amarelo (FIGURA 08) (SCOTTI *et al.*, 2007).

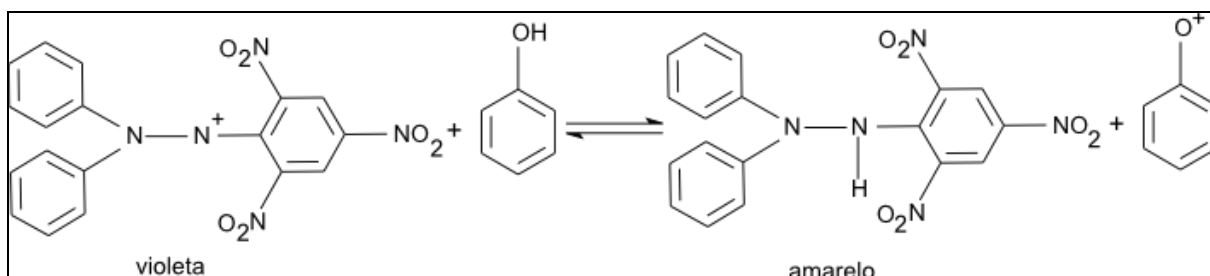


FIGURA 8 - MECANISMO DE REAÇÃO DO REAGENTE 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA (DPPH) COM ANTIOXIDANTE
FONTE: SCOTTI *et al.* (2007)

Ao ser monitorada a reação de redução do radical livre DPPH, utilizando o método espectrofotométrico, detecta-se a mudança de coloração em função da capacidade de algumas substâncias, entre elas os compostos fenólicos, de doarem o hidrogênio radicalar ao reagente radical livre DPPH, que o sequestra, formando um radical estável. Esse fato está associado à propriedade antioxidante (FENGLIN, 2004).

A verificação quantitativa dos fenólicos totais utiliza como um dos métodos o Folin-Ciocalteu, um método espectrofotométrico na faixa visível, no qual o conteúdo total de compostos fenólicos é determinado pela redução de reagentes de oxidação-redução específicos, como o ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, formando um complexo de coloração azul. As moléculas não reduzidas permanecem amarelas e decompõem-se vagarosamente em pH alcalino (FOLIN e CIOCALTEU, 1927). Este método não disponibiliza uma visão completa da qualidade e da quantidade dos constituintes no extrato (WOJDYLO, OSZMIANSKI e

CZEMERYYS 2007), visto ser influenciado por diversos fatores, tais como a natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes, dentre os quais, os terpenos e a clorofilas (SHAHIDI e NACZK, 1995)

2.5 USO DE CLAE-EM/EM PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

A otimização dos processos de isolamento, purificação e caracterização dos princípios ativos dos produtos naturais, mostra-se complexa, demorada e pouco seletiva, garantindo altos custos aos padrões destes compostos quando vendidos comercialmente e disponíveis no mercado.

O emprego de cromatografia em coluna, em camada delgada, centrífuga ou não, são algumas técnicas cromatográficas desenvolvidas para facilitar o isolamento de marcadores em plantas, nas quais a fase estacionária mais comum utilizada é a sílica. Quando os constituintes das plantas apresentam um acentuado caráter polar, a separação torna-se ineficiente, devido à sua forte interação com essa fase estacionária. Para minimizar estes efeitos, foi divulgada por Bottoli (2002) e Tonhi (2002) uma técnica cromatográfica simples de funcionalização da sílica com polímeros, resultando em uma fase estacionária semelhante à de sílica C-18 comercial. Outra técnica desenvolvida especificamente para isolamento de produtos naturais, propõe o SephadexTM LH-20 como fase estacionária, consistindo num gel formado por dextranos, polissacarídeos de elevada massa molecular, composto por unidades de α -D-glicose ligadas predominantemente por ligações glicosídicas 1-6 (GE HEALTHCARE, 2006).

Já, para a quantificação, a literatura reporta uma tendência acentuada na aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência. Recente pesquisa divulgou os resultados quantitativos de extratos de erva mate comercial, adquiridos por Peres e Rodriguez-Amaya (2007), em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrômetro de Massas com ionização por *electrospray* (CLAE-ESI/EM).

A primeira aplicação geral da espectrometria de massas ocorreu no início da década 1940 como técnica de análise quantitativa pela indústria petrolífera. A partir dos anos de 1950 os instrumentos começaram a ser adaptados para identificação estrutural de uma ampla variedade de compostos orgânicos. Na década de 1980, houve mudanças significativas, causadas pelo desenvolvimento de métodos para produzir íons de moléculas não-voláteis ou termolábeis, muito comuns para bioquímicos e biólogos, crescendo em proporções gigantescas nos últimos anos. Atualmente é aplicada, inclusive na determinação de proteínas e biopolímeros de alta massa molecular.

O ponto de partida para uma análise por espectrometria de massas é a formação de íons gasosos do analito, bombardeado com um agente ionizante apropriado. O aparecimento do espectro de massas de uma certa espécie molecular é altamente dependente do método usado para a formação dos íons e a detecção de compostos em misturas químicas complexas, pode acontecer em concentrações na ordem de uma parte em 10^{12} (partes por trilhão – ppt) (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Dentre os vários tipos de instrumentos utilizados para medidas de massa molecular encontrados atualmente, um espectrômetro, basicamente, pode ser dividido em três partes: fonte de ionização, analisador e detector (FIGURA 09).

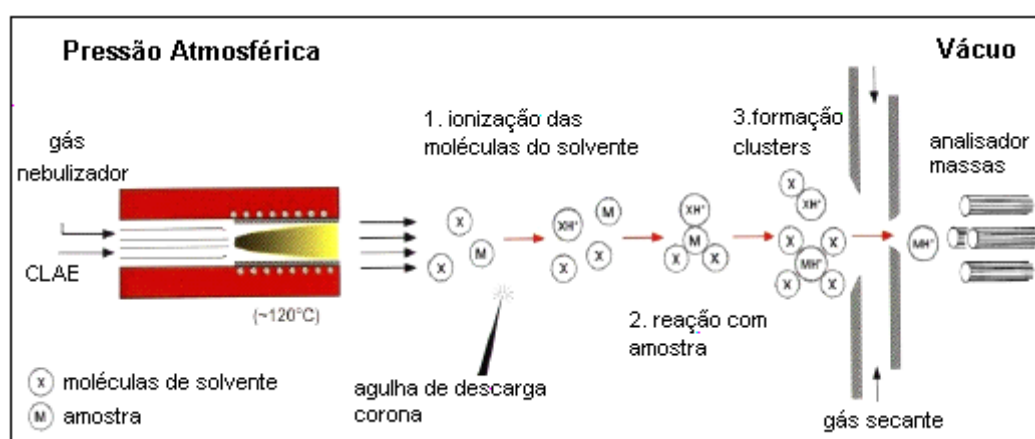


FIGURA 9 - ESQUEMA DAS ETAPAS DE ANÁLISE EM UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

FONTE: Applied Biosystems do Brasil, citado por DE JESUS (2007)

A espectrometria de massa por ionização atmosférica normalmente utiliza de interfaces como *electrospray* e ionização química, à pressão atmosférica; o que garante um processo mais brando ao ionizar as moléculas, evitando que se decomponham. Na interface *electrospray* as moléculas dos compostos são ionizadas em fase líquida com o auxílio de uma descarga elétrica de alta voltagem e depois dessolvatadas (FENN, 1993). Na ionização química, o processo ocorre em fase gasosa com transferência de cargas, onde os compostos primários (N_2 , O_2 e H_2O) presentes no ar são ionizados pela descarga corona do capilar. Estes transferem sua carga para íons secundários formados pelas moléculas dos solventes que, por sua vez, doam ou retiram prótons dos compostos, formando íons moleculares (KOLAKOWSKI *et al.*, 2004).

Entre as interfaces, a de fase gasosa por eletronebulização (ESI-MS, *electrospray ionization/mass spectrometry*) tem crescente aplicação e difusão nas mais variadas áreas do conhecimento científico e merece especial atenção por ser instrumento de análise empregado para as amostras de erva mate, no presente trabalho.

Descrita pela primeira vez em 1984, esta técnica de ionização distingue-se das outras em pelo menos três características:

- capacidade para produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo, assim, a razão massa/carga (m/z) e tornando possível analisar compostos de elevada massa molecular, 100 mil Da ou mais (polipeptídeos, proteínas, oligonucleotídeos), em praticamente todos os tipos de analisadores;
- amostras são introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação;
- técnica de ionização suave, permitindo que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa (DUARTE, 2000).

Nessa técnica, uma solução da amostra é bombardeada através de uma agulha capilar de aço inoxidável, com vazão de alguns microlitros por minuto, circundada por eletrodo cilíndrico e mantida em vários quilovolts (FIGURA 10). Este potencial elétrico promove a migração de cargas para a interface capilar/solução, formando uma dupla camada elétrica.

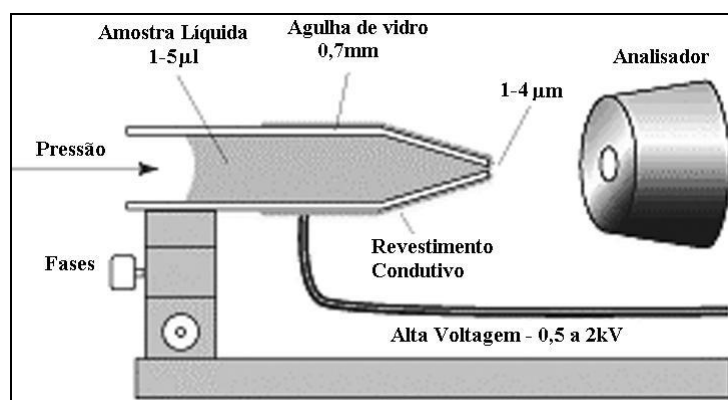


FIGURA 10 - ESQUEMA DA IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY

FONTE: Adaptado de www.newobjective.com/electrospray/ (2008)

A nuvem resultante carregada de finas gotículas passa por um capilar de dessolvatação, no qual ocorre a evaporação do solvente e a ligação da carga às moléculas do analito. À medida em que as gotículas ficam menores em consequência da evaporação do solvente pela ação do gás nebulizador (FIGURA 11), suas densidades de carga tornam-se maiores e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática, resultando na dessorção dos íons no gás ambiente, conhecido como *spray* de partículas carregadas (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002; CROTTI *et al.*, 2006).

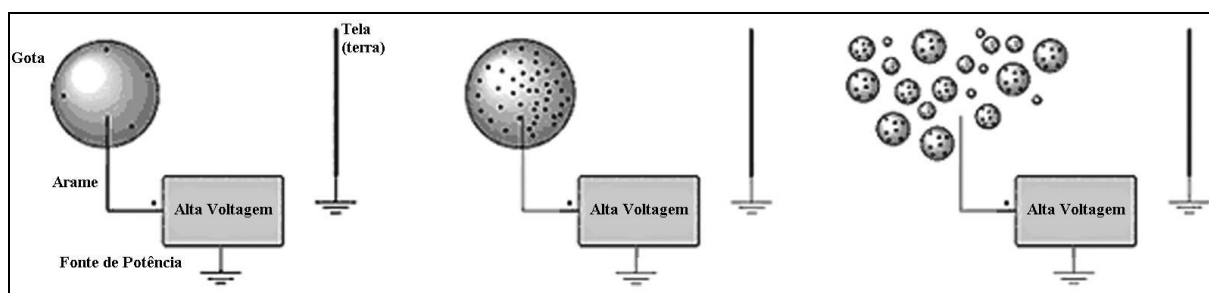


FIGURA 11 - EFEITO DO GÁS NEBULIZADOR SOBRE AS GOTÍCULAS DA SOLUÇÃO EM ANÁLISE

FONTE: Adaptado de www.newobjective.com/electrospray/ (2008)

Durante a ionização, três tipos de íons podem ser gerados no interior do capilar:

- íons moleculares ($M^{+•}$) ou ($M^{-•}$) originados de reação de oxi-redução;

- moléculas protonadas $[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]^-$ geradas de reações ácido/base;
- moléculas cationizadas ou anionizadas, em coordenação com cátions (geralmente Família 1A), ou ânions (principalmente cloretos), $[M+Na]^+$, $[M+Cl]^-$, entre outros. (CROTTI *et al.*, 2006).

A necessidade de alto vácuo (10^{-4} a 10^{-8} torr) ocorre para evitar que as partículas carregadas, inclusive os elétrons, sejam aniquiladas pelas prováveis interações com os componentes da atmosfera, uma oportunidade significativa para que os “íons viajantes” provenientes de uma extremidade do instrumento alcancem o outro lado, sem qualquer interferência das moléculas do ar. Somente o processador de sinal e o dispositivo de saída não são submetidos às baixas pressões.

Destaca-se, entre os sistemas de introdução de amostra, a interface para os sistemas cromatográficos. A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG/EM) tem como limitação ser aplicada apenas a moléculas voláteis e termicamente estáveis, caso contrário, teria que se recorrer a derivatizações, inviabilizando o processo analítico pela demora na análise. Para suprir esta deficiência surgiu um acoplamento semelhante, mas com a cromatografia líquida (CL/EM) (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Os espectrômetros de massas com analisadores quadripolares são normalmente menos caros e mais robustos que aqueles com setor magnético. Este analisador quadripolar possui altas velocidades de varredura, permitindo-as em tempo real de picos cromatográficos e é constituído por quatro hastes cilíndricas paralelas que servem de eletrodos. As hastes opostas estão conectadas eletricamente, com um par ligado ao lado positivo de uma fonte de corrente contínua e outro par ligado ao terminal negativo. A estes pares são aplicados potenciais de radiofrequência variáveis e entre as hastes os íons são acelerados por um potencial de 5 a 10V para se obter o espectro. Simultaneamente são aumentadas as voltagens de corrente alternada e corrente contínua nas hastes, enquanto sua razão é mantida constante. Num dado tempo, os íons atingem as hastes e são convertidos em moléculas neutras, exceto aqueles com valores num intervalo limitado na sua razão massa (m), carga (z) (m/z), que alcançam o transdutor e são separados de

acordo com esta razão. Os íons separados são detectados e este sinal enviado para um sistema de dados onde as razões são armazenadas. Estes analisadores resolvem íons com diferenças de apenas uma unidade de massa (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

O detector, chamado de CEM (*channel electron multiplier*), detecta os íons que sobreviveram a viagem através do analisador de massas. A colisão destes íons com a superfície de um eletrodo origina elétrons primários, atraídos pela superfície de um segundo eletrodo, onde se chocam, produzindo elétrons secundários em maior número. Esse processo se repete por mais uma vez, transmitindo este sinal em números através de contagem de elétrons por segundo (cps) proporcionalmente a quantidade de íon que chegam ao detector (CROTTI, 2006).

Quando instrumentos ou técnicas analíticas se unem para ganho de eficiência, a nova metodologia passa a ser conhecida como *método hifenado*. Um exemplo deste é a associação de dois espectrômetros de massas, no qual o primeiro isola os íons moleculares dos vários compostos da mistura e os encaminha, um a um, para sua fragmentação num segundo espectrômetro, gerando uma série de espectros de massas, um para cada íon molecular produzido. Essa técnica também é denominada de “espectrometria de massas sequencial”.

Um espectrômetro de massas sequencial é constituído de várias combinações de setores magnéticos (B), eletrostáticos (E) e filtros de separação quadripolar (Q). Como exemplo: um instrumento BE é formado de um setor magnético seguido de um setor eletrostático; um instrumento QQQ, mais utilizado atualmente, tem configuração de triploquadropolo (FIGURA 12). Nesta metodologia, a amostra é introduzida numa fonte de ionização mole, como são conhecidas as fontes de ionização química, cujos íons ($M^{+•}$ ou $M^{-•}$), ou moléculas ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$), produtos da ionização, passam a ser designados como precursores (modo EM1). Esses produtos são acelerados no primeiro estágio de separação, um filtro quadripolar comum, passando em seguida para o quadropolo dois, uma câmara de colisão na qual acontece a fragmentação dos íons precursores, originando os íons filhos (modo EM2). Este quadupolo é operado em modo de radiofrequência capaz de

focalizar de maneira eficiente os íons espalhados. No terceiro quadrupolo, os íons secundários resultantes, são varridos e registrados no modo usual.

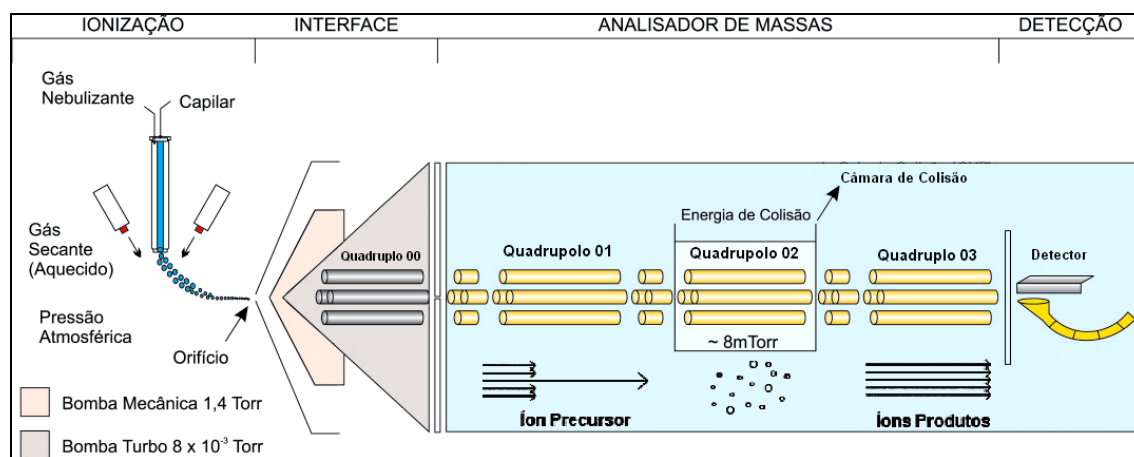


FIGURA 12 - SISTEMA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS TRIPLOQUADRUPOLO API 4000™ EQUIPADO COM FONTE DE ELECTROSPRAY (ESI/EM/EM)
FONTE: Modificado pelo autor

Dos Santos Pereira *et al.* (2005) afirmam que o desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, a ionização por eletronebulização (ESI), possibilita a união de duas ferramentas analíticas de significativa importância, a espectrometria de massas (EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tornando-as um método (CLAE-EM) aplicável a uma grande variedade de matrizes.

Devido à necessidade de métodos analíticos cada vez mais sensíveis (capazes de analisar substâncias em amostras de plasma na ordem de ppb até ppt, em amostras com volume disponível de somente 2,0 mL) a espectrometria de massas (principalmente a CLAE-EM/EM), apresenta importância crescente. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas triploquadrupolo em série, apresenta enormes vantagens, principalmente em relação à simplicidade da preparação da amostra e tempo de análise, normalmente rápidas (DOS SANTOS PEREIRA *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

- Avaliar o conteúdo das frações polares do extrato bruto da erva mate (*Ilex paraguariensis*), aplicando técnicas cromatográficas para o isolamento dos compostos fenólicos e métodos instrumentais para suas caracterizações.
- Quantificar os compostos fenólicos por meio da espectrometria de massas, nos diferentes estágios de produção industrial, definindo o método mais adequado para suas extrações das folhas da planta.

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver protocolo para isolamento e purificação dos cafeoil e dicafeoil quínicos do extrato bruto da erva mate (*Ilex paraguariensis*), para serem utilizados como padrões de referência na quantificação;
- Produzir a γ -lactona bicíclica do ácido quínico, a quinida, para ser utilizada como padrão de referência na quantificação;
- Confirmar as estruturas moleculares dos padrões puros obtidos em bancada, por diferentes métodos instrumentais de análise;
- Elaborar metodologias para melhor extração dos compostos fenólicos das amostras de erva mate (*Ilex paraguariensis*), por meio de planejamento fatorial fracionário, definindo os fatores de maior influência;
- Produzir extratos de amostras de erva mate *in natura* e processadas industrialmente, baseando-se nas condições com maior rendimento obtidas a partir do planejamento fatorial;

-
- Quantificar os compostos fenólicos isolados e identificados em bancada, bem como o ácido cafeico livre e o ácido quínico, em amostras de erva mate *in natura* e nas amostras obtidas em diferentes etapas do processamento industrial;
 - Avaliar o conteúdo de cafeicos totais por meio da hidrólise alcalina das amostras de erva mate *in natura* e nas amostras obtidas em diferentes etapas do processamento industrial;
 - Estimar os teores de fenólicos totais nas amostras de erva mate, antes do processamento (*in natura*) e após o processamento;
 - Mensurar o potencial antioxidante das amostras de erva mate, *in natura* e processadas industrialmente.

4 Experimental

4.1 ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1 Utilizados em cromatografia

Foram utilizados ácido cafeico 98% de pureza (Merck) e ácido quínico 98% de pureza (Aldrich), como padrões cromatográficos.

Para cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, solventes grau P.A.: ácido fórmico, pureza 98,0% (Merck), acetato de amônio, pureza 98,0%, (Riedel), metanol (Merck art. 2007), acetonitrila 99.9% (Merck) e água ultra-pura.

Como fases estacionárias para as separações cromatográficas e de acordo com o tipo de separação:

- Empregaram-se lâminas com espessura de 0,2 mm de sílica Si-60 F254 (Merck, art. 5554), como adsorventes para cromatografia em camada delgada – CCD;
- Para preparo da sílica em fase reversa com polímero polimetiloctadecil-siloxano – PMODS - (Petrarch, CAS 68607-75-0), utilizou-se sílica Si-60 (Merck, art. 7744 e 7736), 40-63 µm;
- Para fracionamento dos extratos, Sephadex™ LH-20.

Como reveladores dos cromatogramas em CCD, foram preparadas as soluções:

- 1% de difenilboriloxietilamina (NP) em metanol e 5% de polietileno glicol-4000 (PEG) em etanol (WAGNER 1995, p. 362), para visualização dos compostos fenólicos;
- 10% de cloreto férrico em água, também para visualização dos compostos fenólicos;

- Solução aquosa de H_2SO_4 5%, sulfato cérico 1% e ácido molibdofosfórico 2,5%, para a revelação do ácido quínico e da quinida;
- Ácido sulfúrico, metanol (1:1) -revelador universal, para os demais constituintes.

A análise dos cromatogramas em CCD ainda foi viabilizada pelo uso do soprador térmico Skil 8003 e câmara escura dotada de lâmpada ultravioleta, marca Spectroline, modelo CM-10, com comprimentos de onda de 365 nm e 260 nm.

Ainda foram utilizados:

Para cromatografia em camada delgada centrífuga, o Chromatotron[®].

Coletor de frações marca Teledyne Isco, modelo Retriever 500.

Para CLAE, equipamento da marca VARIAN, composto de bomba quaternária modelo 9012; injetor automático modelo AI200; detector de arranjo de fotodiodos modelo 9065 e software da Waters; coluna Varian Res Elut. Fases estacionárias: C_{18} de 150 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 μm de tamanho de partícula e 90Å de tamanho de poro e C_{18} , 8 μm de tamanho de partícula, 60Å de tamanho de poro.

Membranas de Nylon[®] com poros de 0,2 μm de diâmetro, da Pall Corporation, para filtração dos extratos antes da injeção.

Purificador de água marca Millipore, modelo Simplicity 185.

4.1.2 Utilizados em espectrometria

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram adquiridos em dois equipamentos: Bruker AC-200, operando a 200 MHz para ^1H e Bruker Avance DRX400, operando a 400 MHz, de 9,4 Tesla, equipado com sonda de 5mm multinuclear, para ^1H e ^{13}C . Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Como solvente água e metanol deuterados, e como padrão de referência interna o tetrametilsilano (TMS).

Os espectros de massas foram registrados por espectrômetro de massas triploquadrupolo modelo API 3000, com interfaces *electrospray* e de ionização química, marca *Applied Biosystems/MSD/Sciex* acoplado a cromatógrafo em fase líquida, contendo módulo desgaseificador, bomba quaternária, forno de coluna e amostrador automático, modelo 1100 da marca Agilent Technologies com coluna cromatográfica C18 de 150 mm comprimento X 4,6 mm de diâmetro interno X 5 µm de tamanho de partícula e 80Å de tamanho de poro (marca Agilent Technologies).

E ainda:

- Gerador de ar e nitrogênio de alta pureza, 99,999%, marca Peak scientific;
- Bomba infusora para microseringa, marca Havard;
- Filtros de seringa PTFE 0,22 µm, 13 mm, marca Millipore;

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em aparelho Excalibur série Bio-Rad FTS3500GX.

Espectrofotômetro Shimadzu, mod. UV-2401PC, UV-vis, para determinação de fenólicos totais e capacidade antioxidante.

4.1.3 De utilização variada

Foram utilizados:

Ácido acético glacial P.A. 99,7% (Synth), ácido *para*-tolueno sulfônico monohidratado 98% (Aldrich); Reativo de Folin 2N (Merck) e DPPH (2,2-difenil-1 picril-hidrazila) (Sigma).

Solventes de grau comercial, destilados antes do uso, para as extrações, análises físico-químicas e sistemas cromatográficos: dicloro metano, acetato de etila, etanol, acetona e hexano;

Hidróxido de sódio P.A. 97% (F. Maia); ácido clorídrico P.A. (Vetec); ácido ascórbico 99% (Synth); cloreto de sódio (Vetec) e EDTA (Reagen), com pureza de 99%, para a hidrólise.

Evaporador de frações Büchi, modelo Syncore Polyvap, para evaporação do solvente das frações provenientes das colunas de separação e evaporadores rotatórios à pressão reduzida das marcas Büchi, modelo R 114 e Tecnal, modelo TE.

E ainda:

Balança eletrônica analítica marca Ohaus, modelo Explorer.

Moinho tipo Willye marca Tecnal, modelo TE648.

Incubador-agitador orbital marca Ética, modelo 500.

Spray-dryer marca Büchi, modelo B290.

Agitador Vórtex Genie 2[®] da Scientific Industries.

Agitador mecânico Ika Labortechnik, modelo RW 20.n.

Banho ultrassônico marca Unique, modelo USC700.

Microcentrífuga marca Labnet, modelo Force 7.

Bomba de vácuo marca Fisatom, modelo 825T.

Medidor de pH marca Quimis, modelo Q400A.

4.2 PREPARAÇÃO DA SÍLICA EM FASE REVERSA

Foi utilizado o método proposto por Bottoli (2002) e Tonhi (2002). Durante 24 horas, 500 gramas de sílica 240-400 mesh foram ativadas em estufa a 150°C. Após este período, 250 g do polímero PMODS foram dissolvidos em hexano, sob agitação lenta e constante, à temperatura ambiente. Gradativamente, a sílica foi adicionada sobre a mistura solvente/polímero, mantendo sob agitação durante 3 horas. Em seguida, o solvente foi evaporado à temperatura ambiente por 24 horas e em estufa a 40°C até que a mistura estivesse completamente seca e, então, aquecida a 120°C por 4 horas. Para extrair o excesso de polímero, a sílica funcionalizada com o polímero foi lavada com acetato de etila e metanol e, finalmente, deixada para secar à temperatura ambiente e depois a 60°C.

4.3 PREPARO DA SEPHADEX™ LH-20

Seguindo instruções descritas em Ge Healthcare (2006), no preparo da Sephadex™ LH-20, foram homogeneizadas constantemente, por três horas, aproximadamente 15 g de Sephadex™ LH-20, em água. Em seguida, foi empacotada coluna de vidro com 1,8cm de diâmetro interno e 35,5cm de comprimento com o gel.

4.4 AMOSTRAS

4.4.1 Preparo da amostra de erva mate na indústria

A erva mate, colhida do campo, passa por processo de sapeco - passagem dos ramos com folhas, pela rápida ação das chamas do sapecador, que faz a retirada da umidade superficial das folhas e inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase. A temperatura inicial é de 400°C, de saída de 65°C e tempo de residência de aproximadamente 8 minutos. Em seguida, o conjunto passa pelo processo de secagem, feita em secadores mecânicos e conduzido para o processo de cancheamento - trituração ou fragmentação das folhas e talos – passando então a ser nomeado erva cancheada.

A erva cancheada sofre o beneficiamento (engenho), onde ocorre a separação das folhas e talos. Nesta etapa são formados os subprodutos, gerados após passagem por um conjunto de peneiras, ventiladores e filtros coletores de pó. Esse processo origina folhas de granulometria diferentes, pó, talo beneficiado e resíduo. Todos esses subprodutos podem ser utilizados na composição do chimarrão.

A erva cancheada, após ser beneficiada no engenho, passa pelo processo de tosta e sofre alteração de cor. A temperatura, nos cilindros torradores, atinge temperaturas superiores a 100°C. O produto tostado possui granulometria variada de folha e talo beneficiado e após o processo de extração para obtenção do chá mate comercial, origina o resíduo sólido, denominado borra.

O subproduto resultante da produção do chá mate, a borra, não sofre outro tratamento físico ou químico e não desempenha nenhum papel na cadeia produtiva, nem como biomassa, sendo descartada pela indústria.

4.4.2 Especificação das amostras

Os experimentos para a obtenção do extrato bruto foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Paraná, com erva mate industrializada, da marca “Chimarrão 81”, produzida por Erva mate Schier Ind. e Com. LTDA, fabricada em 14/02/2005, com validade do produto até 10/07/2005, sem identificação de lote, adquirida no comércio da cidade de Curitiba e com a seguinte descrição na embalagem: “*PN-1 – Contém 100% Erva mate, sendo 70% (mínimo) de folhas e 30% (máximo) outras partes do ramo*”. A erva mate comercial não foi submetida a nenhum tratamento, sendo utilizada no experimento tão logo adquirida no comércio.

Para a obtenção do extrato bruto dos grãos verdes de café, a amostra foi adquirida no Mercado Municipal da cidade de Curitiba, a granel, sem especificação de lote ou qualquer outra informação, imediatamente utilizada no experimento.

Para quantificação dos compostos de interesse, as amostras foram fornecidas pela indústria Leão Júnior, em julho de 2007. A Unidade de Fernandes Pinheiro (PR) disponibilizou as folhas verdes secas (FVS), folhas tostadas (FT) e erva mate comercial (EMC) da marca “Pampas” e a Unidade do Rio de Janeiro (RJ), a borra do chá mate (BCM). As folhas verdes frescas (FV) foram colhidas

diretamente dos pés de erva mate cultivados no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

As quatro amostras de erva mate processadas (FVS; FT; EMC e BCM) foram moídas, passadas por peneira de 0,59 mm de orifício (30 Mesh) e mantidas em freezer. Imediatamente antes dos experimentos foram retiradas, com tempo suficiente para ambientação térmica. As folhas verdes frescas, colhidas nos dias de análise, foram partidas ao meio, mergulhadas em nitrogênio líquido, trituradas com pistilo, moídas em moinho tipo Willye e peneiradas enquanto congeladas. 5,0032 g foram submetidos ao aquecimento em estufa a 60°C por 48 horas até massa constante, originando amostra denominada folhas verdes desidratadas (FVD).

4.5 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS PADRÕES

Alguns padrões de referência utilizados na quantificação de diferentes extratos foram obtidos através do isolamento de moléculas de amostras vegetais, outros, adquiridos no comércio e a quinida foi sintetizada em bancada. Os compostos tiveram suas estruturas confirmadas por meio de análises instrumentais, como infravermelho e ressonância magnética nuclear, além da identificação dos fragmentos obtidos em espectrômetro de massas.

4.5.1 Isolamento do ácido neoclorogênico e dos isômeros do ácido dicafeoilquínico do extrato bruto de erva mate

No preparo do extrato bruto de erva mate foram transferidos 500 g de erva mate para chimarrão para frasco de vidro e acrescentados 2,5 L de solução aquosa de metanol 60%. Em seguida, a mistura foi homogeneizada vigorosamente e o frasco foi lacrado e armazenado em ambiente fresco e escuro. A homogeneização

foi repetida por várias vezes durante o dia, por três dias consecutivos, e a mistura filtrada a vácuo. O resíduo sólido da filtração foi recolhido novamente ao frasco de vidro, misturado com 2 L de metanol 60% e repetidos os procedimentos de homogeneização e filtração, por mais duas vezes. Posteriormente, o líquido filtrado de cor caramelo, resultado das quatro filtrações (12 dias aproximadamente) foi misturado, em funil de separação, com hexano, na proporção de 1:1 (uma parte do líquido de cor caramelo para uma parte de hexano), para separação das frações apolares da amostra. O extrato hexano/constituintes apolares da amostra foi recolhido em frasco limpo e seco e novo volume de hexano foi adicionado ao funil de separação contendo o extrato do mate, para uma segunda extração. Esse procedimento foi repetido tantas vezes quanto necessário até aparência límpida do hexano. O extrato hexano/constituintes apolares da amostra foi concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida, para recuperação do solvente e os constituintes apolares foram descartados por não atenderem ao propósito desta pesquisa. O extrato sobrenadante da amostra de erva mate, contendo um grupo menor de compostos, foi concentrado em evaporador rotatório, à pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 55°C, resultando no extrato bruto da erva mate, de consistência pastosa e coloração escura, livre dos compostos apolares e de solventes orgânicos. Este extrato foi seco em *spray-dryer* e aproximadamente 70% do extrato bruto da erva mate, obtido na forma de pó, de cor amarelada, foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em geladeira.

Para fracionamento do extrato bruto de erva mate em sílica foram acondicionados em coluna de vidro de 60 cm de comprimento, 4,5 cm de diâmetro, 72 g da sílica em fase reversa PC-18 sob pressão em bomba de vácuo. A sílica foi ambientada em água após completo empacotamento. Em seguida foi dissolvido um grama do extrato bruto seco da amostra de erva mate, em 3 mL de água e aplicado na coluna. Para eluição foram utilizados, sob pressão atmosférica normal, volumes iguais de solventes com gradiente de polaridade: água, água/metanol (4:1; 3:2; 1:1; 2:3 e 1:4) e metanol puro. As frações obtidas foram analisadas por CCD, com revelador NP/PEG e com fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água (100:11:11:26) e reunidas por semelhança nos perfis cromatográficos.

Em seguida, o solvente das frações foi evaporado e os resíduos secos foram armazenados em frascos sob atmosfera inerte, na geladeira, até confirmação de suas estruturas.

Para fracionamento do extrato bruto de erva mate em SephadexTM LH-20, duzentos miligramas do extrato bruto seco da amostra de erva mate foram dissolvidos em 1 mL de água e aplicados na coluna. Foram utilizados, como fase móvel, aproximadamente 25 mL de cada um dos gradientes de polaridade água, água/metanol (3:1; 1:1; e 1:3) e metanol puro. As frações recolhidas em tubos de ensaio, com volumes próximos a 10 mL (descartado o volume morto) foram analisadas por CCD. Outra fase móvel utilizada foi uma mistura de acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água (100:11:11:26). As frações semelhantes em seus perfis cromatográficos por análise em CCD foram concentradas, separadamente, em evaporador rotatório e os resíduos secos foram então armazenados em frascos, na geladeira, sob atmosfera inerte.

Para identificação da estrutura, o espectro de RMN de ¹H, para a mistura de isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos, foi obtido em equipamento operando a 400 MHz, com o composto dissolvido em metanol-d₄ com gotas de óxido de deutério (D₂O), utilizando como padrão interno de referência TMS.

4.5.2 Isolamento do ácido clorogênico dos grãos de café

Para oportunizar a continuidade dos experimentos previstos no projeto, incluindo a quantificação dos isômeros do ácido clorogênico e garantir pelo menos algum padrão de referência, optou-se pela preparação do extrato bruto dos grãos verdes de café, considerado pela literatura como amostra de considerável teor de cafeoil quínicos. Para tanto, foram triturados em moinho tipo Willye, 250 g de grãos verdes do café e mantidos em 1 L de solução aquosa de metanol 50%, sob agitação constante em incubador-agitador, por 24 horas. O líquido extrator da mistura foi separado por filtração e acrescentado ao resíduo sólido com mais 1 L de solução

hidroalcólica, de mesma concentração. Os procedimentos de agitação e filtração foram repetidos por mais duas vezes, com descarte do resíduo sólido ao final do processo. O volume líquido resultante da filtração foi colocado em reação com 80 mL de cada um dos reativos de Carrez, para clarificar a amostra. De acordo com Nogueira (2003), esse reativo é composto por uma SOLUÇÃO A, formada por 21,9% (m/v) de acetato de zinco em água contendo 3 mL de ácido acético glacial e uma SOLUÇÃO B, formada de ferrocianeto de potássio 10,6%, também em água. O novo resíduo sólido obtido (Cf-1.1) foi filtrado, lavado com metanol e mantido em ultrassom por 20 minutos e o volume do líquido clarificado por reativos de Carrez foi levado a evaporador rotatório à pressão reduzida. Em seguida, esse concentrado foi misturado com acetato de etila, em funil de separação, para reduzi-lo aos compostos polares do café. De imediato houve a formação de um precipitado esbranquiçado (Cf-1.2), separado por filtração. À parte líquida, foi adicionado metanol, originando novo precipitado amarelo (Cf-1.3), armazenado após filtração. Finalmente, a fração líquida remanescente foi filtrada em sílica, para retenção dos resíduos da solução de Carrez, resultando em Cf-1, que depois de ser concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida, foi armazenado.

Para fracionar Cf-1.3, o precipitado amarelo de fator de retenção - R_f 0,45, obtido do extrato bruto dos grãos verdes de café, foram acondicionados 72 g da sílica em fase reversa PC-18, sob pressão, em bomba de vácuo, em coluna de vidro de 60 cm de comprimento 4,5 cm de diâmetro, ambientada em água, após completo empacotamento. Foram dissolvidos 50 mg do resíduo seco de Cf-1.3 em 1,5 mL de água e aplicados na coluna. Para eluição foram utilizados, sob pressão atmosférica normal, volumes iguais de solventes com gradiente de polaridade: água acidificada com ácido acético (pH=3); água e metanol. Quinze frações foram recolhidas em tubos de ensaio (descartado o volume morto) e analisadas por CCD, com revelador NP/PEG e com fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água (100:11:11:26). As frações com R_f de 0,45 foram reunidas por semelhanças em seus perfis cromatográficos e armazenadas na geladeira, em frascos sob atmosfera inerte, até avaliação de suas estruturas.

O espectro de RMN de ^1H foi adquirido com o composto dissolvido em óxido de deutério (D_2O) e executado com supressão dos sinais dos hidrogênios da água para garantir uma melhor relação sinal/ruído.

4.5.3 Obtenção da quinida

Foi utilizado método proposto por Evans (2002) para a lactonização do ácido quínico, com pequenas modificações. Foram destilados previamente 300 mL de benzeno e transferidos para balão de destilação contendo 500mg (2,26 mmol/L) do ácido quínico e 50 mg (0,29 mmol/L) de ácido *para*-tolueno sulfônico. O balão foi aquecido e o solvente mantido por refluxo em aparelho de Dean-Stark por aproximadamente 22 horas. O benzeno foi removido em evaporador rotatório, à pressão reduzida, e ao resíduo foram acrescentados 200 mL de acetato de etila, para lavagem. A mistura foi filtrada e o sólido recolhido. Análise em CCD de uma fração de 5 mg do sólido, dissolvidos em metanol/acetato de etila 3:1, e tendo como fase móvel uma mistura dicloro metano/acetato de etila 4:1, revelou dois compostos, um de R_f 0,35 e outro de R_f 0,42. Cem miligramas deste resíduo foram aplicados em Cromatotron[®], para fracionamento. Como fase móvel foi utilizado 100 mL um gradiente variando de metanol/acetato de etila 1:1 a metanol puro, sendo coletadas frações de 5 mL. Após análise por CCD, foram reunidas por semelhança nos mesmo perfis cromatográficos. O solvente foi evaporado e o composto de R_f 0,42 dissolvido em acetonitrila/metanol 4:1 para cristalização. Parte dos cristais obtidos foi conduzida para análise instrumental, para confirmação da estrutura, e outra parte foi convenientemente armazenada.

O espectro de RMN de ^1H , para identificação da estrutura, foi adquirido com o composto dissolvido em metanol- d_4 .

4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

4.6.1 Planejamento fatorial para avaliação dos fatores de influência sobre a extração de fenólicos da erva mate

Para extração do constituinte de interesse nos ensaios do planejamento fatorial, foi utilizada como matéria-prima uma amostra de erva mate comercial, peneirada através das malhas de um tamis com 0,59 mm de diâmetro de orifício (Mesh 30).

Foi conduzido um planejamento fatorial fracionário 2^{6-1} , num total de 32 experimentos (TABELA 2) mais três repetições no ponto central para a estimativa de erro (BARROS NETO *et al.*, 2001). As variáveis independentes experimentais selecionadas para a elaboração do planejamento fatorial fracionário, idealizadas amparando-se em ensaios prévios, sem dados na literatura, foram massa da amostra, pH e natureza do solvente, tempo de ultrassom, velocidade de centrifugação das amostras e número de extrações. A temperatura não foi selecionada para compor o planejamento, pois requer condições especiais para que seus valores sejam mantidos durante o desenvolvimento do experimento. Os maiores valores de pH foram escolhidos com base naqueles naturais ao solvente, no momento do experimento, sem que houvesse necessidade de se adicionar base ao meio, provocando alterações nos fenólicos não previstas na avaliação. O limite inferior foi estipulado através da adição de ácido acético empregado nos experimentos iniciais de fracionamento do extrato.

TABELA 2 – VARIÁVEIS INDEPENDENTES DE CONTRASTE PARA O PLANEJAMENTO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DA ERVA MATE

ENSAIO	t_{us}	pH_{sv}	m_{am}	n_{ex}	SV	V_{cent}
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	+
3	-	+	-	-	-	+
4	+	+	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	+
6	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	-	-	-
8	+	+	+	-	-	+
9	-	-	-	+	-	+
10	+	-	-	+	-	-
11	-	+	-	+	-	-
12	+	+	-	+	-	+
13	-	-	+	+	-	-
14	+	-	+	+	-	+
15	-	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	-	-
17	-	-	-	-	+	+
18	+	-	-	-	+	-
19	-	+	-	-	+	-
20	+	+	-	-	+	+
21	-	-	+	-	+	-
22	+	-	+	-	+	+
23	-	+	+	-	+	+
24	+	+	+	-	+	-
25	-	-	-	+	+	-
26	+	-	-	+	+	+
27	-	+	-	+	+	+
28	+	+	-	+	+	-
29	-	-	+	+	+	+
30	+	-	+	+	+	-
31	-	+	+	+	+	-
32	+	+	+	+	+	+

t_{us} = tempo de ultrassom; pH_{sv} = pH do líquido extrator; m_{am} = massa da amostra; n_{ex} = número de extrações; sv = natureza do solvente; v_{cent} = velocidade de centrifugação

FONTE: O autor (2008)

As variáveis dependentes selecionadas foram os teores de ácido quínico, ácido clorogênico e ácido cafeico. Na (TABELA 3) estão indicados os níveis das

variáveis independentes do experimento, idealizados com base em ensaios prévios, sem dados na literatura.

TABELA 3 – CODIFICAÇÃO E NÍVEIS REAIS DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS DEFINIDAS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{6-1}

VARIÁVEIS	LEGENDA	NÍVEIS	
		(-)	(+)
Tempo de ultrassom (min.)	t_{us}	10	20
pH do líquido extrator	pH_{sv}	4,0	7,0
Massa da amostra (mg)	m_{am}	20	80
Número de extrações	n_{ex}	1	3
Natureza do solvente	sv	metanol	água
Velocidade de centrifugação (rpm)	v_{cent}	5.000	10.000

FONTE: O autor (2008)

Também foi elaborado experimento, em triplicata, com o valor médio dos níveis de todas as variáveis contempladas no planejamento: $t_{us} = 15$ min.; $pH_{sv} = 5,5$; $m_{am} = 50$ mg; $n_{ex} = 2$; $sv = \text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1); $v_{cent} = 8000$ r.p.m.

Para auxiliar na avaliação sobre qual combinação de fatores resultaria nas condições ideais para a extração dos analitos da erva mate, foi utilizado o software estatístico Minitab 15 (2007). Esse programa permite criar um experimento fatorial, examinar o relacionamento entre os fatores, ajustar um modelo aos dados e gerar gráficos para avaliação dos efeitos (gráfico de probabilidade normal, diagrama de Pareto, gráfico de efeito principal e gráfico de interação).

Com os parâmetros previamente definidos no planejamento, alíquotas de 20 e 80 mg da amostra de erva mate industrializada, triturada, tamisada e homogeneizada em sua granulometria, foram pesadas em frascos tipo eppendorf. Volumes de 2,0 mL do líquido extrator, água ou metanol com pH normal e água ou metanol acidificados com ácido acético, foram acrescentados aos frascos. A mistura foi agitada, inserida em aparelho de ultrassom por dez ou vinte minutos em temperatura ambiente e centrifugada por dez minutos a 5.000 ou 10.000 rpm. O sobrenadante, resultante de uma ou de três extrações, foi coletado e os volumes de todos os ensaios corrigidos para 10 mL, em balão volumétrico, com o respectivo líquido extrator. Antes de ser injetada, em triplicata, no sistema CLAE-EM/EM e após

nova centrifugação, 20 µL do volume do líquido extraído foi misturado com 980 µL da fase móvel (solução aquosa de metanol a 75%). A mistura foi filtrada em membrana com porosidade de 0,2 µm e a resposta avaliada foi a área do pico cromatográfico dos analitos.

4.6.2 Determinação de ácido cafeico total

Ao utilizar o método proposto por Nardini *et al.* (2002), de acordo com a melhor resposta para a extração dos compostos fenólicos, definida através do planejamento fatorial, adotou-se, para a hidrólise alcalina, o seguinte procedimento experimental: 0,5 mL dos extratos foram separados em tubos de ensaio, misturados a 4,5 mL de NaOH 2 mol/L e mantidos a 30°C, por 30 minutos. Um volume de 0,5 mL desta solução foi recolhido e acidificado para pH 3, com HCl 4 mol/L. Em seguida, foram adicionados 300 mg de NaCl e acrescentados 4mL de acetato de etila, a cada um dos extratos. Os frascos foram levados a banho ultrassônico por vinte minutos e a fase orgânica sobrenadante removida em tubos de ensaio. Esse procedimento com adição de acetato de etila e remoção da fase orgânica foi repetido por mais duas vezes. O solvente foi então evaporado das frações, em evaporador Büchi, e o resíduo seco dissolvido em 1,0 mL de metanol. Os tubos de ensaio foram depositados em banho ultrassônico por 20 min., centrifugados por 10 min. a 10.000 r.p.m. e a mistura foi diluída na proporção de 1:50 em solução aquosa de metanol 75% para análise em espectrômetro de massas.

O efeito do ácido ascórbico e do EDTA sobre os ácidos fenólicos também foi testado em outra bateria de reações. O procedimento experimental foi similar, mas neste experimento, o NaOH 2 mol/L foi preparado com solução aquosa contendo 10 mmol/L de EDTA e 1% de ácido ascórbico.

O branco recebeu o mesmo tratamento dado às amostras de erva mate, usando 0,5 mg de ácido cafeico dissolvido em 0,5 mL de MeOH. Para verificar a eficiência da metodologia, o branco foi preparado em seis condições diferentes:

Branco 1 (**B1**) - Volume de 4,5 mL de água (sem NaOH);
Branco 2 (**B2**) - Volume de 4,5 mL de solução de NaOH 2 mol/L;
Branco 3 (**B3**) - Volume de 4,5 mL de solução de NaOH 2 mol/L e EDTA 10 mmol/L;
Branco 4 (**B4**) - Volume de 4,5 mL de solução de NaOH 2 mol/L e EDTA 100 mmol/L;
Branco 5 (**B5**) - Volume de 4,5 mL de solução de NaOH 2 mol/L e ácido ascórbico 1%;
Branco 6 (**B6**) - Volume de 4,5 mL de solução de NaOH 2 mol/L, EDTA 10 mmol/L e ácido ascórbico 1%.

4.6.3 Otimização das condições de ionização dos metabólitos por CLAE-EM/EM

Os analitos ($10 \mu\text{g. mL}^{-1}$) foram injetados continuamente na interface *electrospray* utilizando uma bomba infusora com vazão de $10 \mu\text{L. min}^{-1}$. Foram utilizadas as seguintes misturas de solventes para preparação das soluções-padrão: metanol/água (9:1 v/v), metanol/água (9:1 v/v) com ácido fórmico 0,1%, metanol/água (9:1 v/v) com acetato de amônio 5 mM. Os espectros de EM1 gerados no modo positivo e negativo foram armazenados para posterior análise e discussão.

Os parâmetros selecionados para o espectrômetro de massas e a fonte de ionização foram otimizados para possibilitar uma melhor ionização dos analitos. Os seguintes parâmetros foram definidos:

- Interface: *electrospray*;
- Períodos por scan: 10 ciclos ou 0,5 minutos;
- Tipo de scan: EM1;
- Polaridade: negativa;
- Resolução: unit;
- Defletor: -100 V (modo positivo) e 100 V (modo negativo);
- Canal multiplicador de elétrons do detector (CEM): 2300 V;
- Gás nebulizador (NEB): Ar, com 12 psi;
- Cortina de gás (CUR): Nitrogênio, com 8 psi;
- Gás secante: Ar sintético a 8 L / minuto;

- Temperatura do turbo secador: sem ativar;
- Voltagem do spray de íons (IS): 4500 V (modo positivo) e -4500 V (modo negativo);
- Potencial de desaglomeração (DP): 40 V (modo positivo) e -40 V (modo negativo);
- Potencial de Focalização (FP): 190 V (modo positivo) e -190 V (modo negativo);
- Potencial de Entrada (EP): 10 V (modo positivo) e -10 V (modo negativo).

4.6.4 Método de análise – modo MRM – Múltipla Reação Monitorada

Além da definição dos parâmetros para o espectrômetro de massas e a fonte de ionização, buscando melhor ionização dos analitos, também foi elaborado um método de aquisição CLAE-EM/EM, para favorecer a quantificação destes compostos. Foram definidos os seguintes parâmetros analíticos:

- Volume de injeção: 20 μL ;
- Fluxo da fase móvel: 250 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$;
- Composição da fase móvel: Solvente “A” água e solvente “B” (metanol/solução de acetato de amônio 5 mmol/L - 1:1 v/v).
- Gradiente de eluição cromatográfica: Inicial 95% de solvente “A” e 5% de “B” por 4 minutos, com rampa linear para 60% de solvente “B” e 40% de “A” em 0,01 minuto, permanecendo nesta condição por 9 minutos. O gradiente volta a sua condição inicial em 0,01 minutos, até 14 minutos de corrida.
- Tempo de análise: 14 minutos;
- Coluna cromatográfica: C18 de 150 mm comprimento X 4,6 mm de diâmetro interno X 5 μm de tamanho de partícula e 80 Å de tamanho de poro.

Na composição do método MRM, os parâmetros selecionados, para cada fragmento dos compostos analisados, estão registrados na (TABELA 4), em volts (V):

TABELA 4 - PARÂMETROS SELECIONADOS NA COMPOSIÇÃO DO MÉTODO MRM (EM VOLTS) PARA CADA FRAGMENTO DA QUINIDA, ÁCIDO QUÍNICO, ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO, ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E MISTURA DOS ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS

	^a QD		^b QC		^c 3-ACQ		^d 5-ACQ		^e CF		^f Di-ACQ	
Fragmento (em Da)	67,0	92,9	85,0	126,9	179,0	190,8	85,1	191	89,0	134,1	178,9	353,1
DP	-41	-36	-61	-56	-31	-31	-31	-31	-31	-31	-46	-46
FP	-200	-190	-350	-310	-200	-200	-120	-150	-150	-160	-240	-200
EP	-10	-10	-10	-10	-10	-10	-10	-10	-10	-10	-10	-10
CE	-28	-28	-32	-32	-24	-24	-58	-58	-22	-22	-26	-26
CXP	-1,0	-1,0	-13	-13	-3,0	-3,0	-3,0	-3,0	-9,0	-9,0	-9,0	-9,0

^aQD: Quinida; ^bQC: Ácido Quínico; ^c3-ACQ: Ácido neo-clorogênico; ^d5-ACQ: Ácido clorogênico; ^eCF: Ácido cafeico; ^fDi-ACQ: mistura dos isômeros do ácido di-cafeoilquínico

DP: potencial de desaglomeração; FP: potencial de focalização; EP: potencial de entrada; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da cela de colisão.

FONTE: O autor (2008)

E os parâmetros de otimização pelo fluxo (FIA) foram:

- Gás nebulizador (NEB): Ar, com 12 psi;
- Cortina de gás (CUR): Nitrogênio, com 8 psi;
- Voltagem do *spray* de íons (IS) (TABELA 5):

TABELA 5 – VOLTAGENS DO *SPRAY* DE ÍONS (EM VOLTS)

COMPOSTO ANALISADO	MODO POSITIVO	MODO NEGATIVO
Quinida	3000	-4500
Ácido quínico	3000	-4500
Ácido Neoclorogênico	2000	-2000
Ácido clorogênico	3000	-3000
Ácido cafeico	3000	-3000
Dicafeoilquínicos (mistura)	3000	-3000

A limpeza das amostras foi feita por centrifugação e por filtros de seringa PTFE 0,22 µm, 13 mm.

Na definição do método de ionização dos compostos de interesse, foram avaliados parâmetros de ionização por *electrospray*, variando os modos de ionização positiva e negativa, utilizando aditivos diferentes como acetato de amônio e ácido

fórmico, utilizando composições de solvente metanol/água e variando a voltagem da descarga de ionização no caso da ionização química.

Como ação subsequente, foram testadas formas de ionização em modo EM1 para determinar o melhor tipo de ionização ocorrida nos modos positivo e negativo para cada composto; no modo positivo na forma de aduto de sódio $[M+Na]^+$ e negativo na forma desprotonada $[M-H]^-$. Em seguida, foram criados métodos de análise por múltipla reação monitorada (MRM), para saber qual possui a maior sensibilidade para a análise dos compostos da erva mate.

Nesta etapa de otimização automática do método os parâmetros testados pelo equipamento incluíram a fragmentação do íon precursor (pai) e a escolha dos dois íons produtos mais intensos (filhos). Também foi selecionada, automaticamente para cada íon fragmentado, a melhor energia de colisão, potencial de saída da célula de colisão, potencial de desaglomeração e potencial de focalização. Ao final da otimização automática o software criou um método MRM com todas as transições otimizadas.

4.6.5 Curvas de calibração

Seguindo um valor proporcional entre as masas e conforme a quantidade disponível dos compostos isolados, foram pesados, em separado, 11,1 mg de quinida; 10,7 mg de ácido quínico; 8,4 mg de ácido neoclorogênico; 10,1 mg de ácido clorogênico e 10,4 mg de ácido caféico. Os padrões foram dissolvidos, em metanol (quinida, quínico, neoclorogênico e cafeico), com algumas gotas de água, quando necessário, ou apenas água (clorogênico). Cada solução dos padrões foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, o volume completado e a mistura homogeneizada. As soluções estoque foram rotuladas, acondicionadas em frascos com tampa de rosca e armazenadas em freezer.

Volumes destas soluções foram adicionados à fase móvel pré-definida no método de análise, a fim de se obter a curva de calibração de cinco níveis, com as seguintes diluições:

Quinida – 2,0 µg/mL; 5,0 µg/mL; 8,0 µg/mL; 10 µg/mL e 20 µg/mL

Ácido quínico; ácido neoclorogênico e ácido clorogênico – 0,1 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 3,0 µg/mL e 5,0 µg/mL

Ácido cafeico – 0,01 µg/mL; 100 µg/mL; 250 µg/mL; 500 µg/mL e 1000 µg/mL.

Foram efetuadas injeções, em triplicata, da mistura dos padrões, em cada um dos níveis elaborados.

A equação utilizada para cálculo das concentrações mg do analito/100g da amostra, resulta das proporções estabelecidas entre as massas e os volumes envolvidos na análise, desde a alíquota retirada do extrato até a massa inicial da amostra:

$$X = \frac{\text{valor da curva } \mu\text{g}}{\text{peso da amostra em g}} \cdot \frac{\text{mL total do extrato}}{\text{alíquota do extrato em mL}} \cdot \text{volume final do vial} \cdot \text{fator de diluição} \cdot 0,1$$

4.7 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos nos extratos das amostras de erva mate seguiu metodologia baseada no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações (FOLIN e CIOCALTEU, 1927).

Foram transferidas alíquotas de cada um dos extratos aquosos, obtidos através do melhor método de extração, para balão volumétrico de 5 mL, para obter concentrações entre 5 e 20 µg/mL do extrato e misturadas a 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 2 N. Após 5 minutos, foram acrescentados 500 µL de carbonato de sódio a 10% e aferidos os volumes com água destilada. Em seguida, foram mantidos em incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por uma hora e mensuradas as concentrações de fenólicos totais em espectrofotômetro a 760 nm,

utilizando como branco água destilada e como padrão, ácido cafeico nas concentrações de 5; 10; 12,5; 15 e 20 µg/mL. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido cafeico (g de ácido cafeico/100g de amostra).

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A análise da atividade antioxidante nos extratos das amostras de erva mate, teve fundamento na capacidade que os constituintes das amostras possuem em capturarem o radical livre DPPH, seguindo modificações propostas por Andrade (2007).

Foram inicialmente dissolvidos em etanol os padrões dos ácidos ascórbico e cafeico, nas concentrações de 0,5; 10; 15; 20; 25; 50; 75 e 100 µg/mL e definidas as mesmas concentrações para as amostras obtidas através do melhor método de extração. Em seguida foram misturados a 3 mL de cada solução etanólica (padrões e amostras), 100 µL da solução do radical livre DPPH 1mmol/L e mantidas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 30 minutos. Passado este tempo, foi medida a atividade em espectrofotômetro com absorbância ajustada para 517 nm, tendo preparado como branco, uma diluição de cada amostra, nas concentrações definidas e como controle, uma mistura de 3 mL de etanol e 100 µL de solução etanólica de DPPH.

Para avaliar a atividade captadora de radical, foi obtida a porcentagem de inibição, conforme equação (ANDRADE, 2007; BASTOS, 2007):

$$\% \text{Inibição} = \left(\frac{\text{Absorbância do Controle} - \text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância do Controle}} \right) \cdot 100$$

Os resultados também podem ser expressos através do parâmetro IC₅₀, definido como a concentração do substrato que causa 50% da perda da atividade do radical livre DPPH. Foram igualmente preparadas, seguindo procedimento descrito

acima, diluições nas concentrações de 0,5; 10; 15; 20; 25 µg/mL, de cada uma das amostras, buscando determinar, nesta faixa, as equações que favorecessem o cálculo desta grandeza.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DOS EXTRATOS

Inúmeras dificuldades foram encontradas nos experimentos de isolamento dos compostos de interesse. As elevadas polaridades destes compostos, associadas às semelhanças estruturais e facilidade com que se oxidam, são algumas situações que retardam a definição de condições ideais para o isolamento. Somada a isso, a não repetibilidade das condições impostas à separação, demonstrada principalmente com a sílica de fase reversa. Dentre os isômeros dos ácidos clorogênico, comercialmente é possível adquirir, com maior facilidade, apenas o ácido clorogênico (ácido 5-*O*-cafeoilquínico); os demais cafeoil e dicafeoilquínicos não são encontrados para aquisição. Dessa forma, o isolamento acaba sendo o único recurso acessível para utilização desses compostos como padrões.

Comparando-se o desempenho das colunas preparadas com sílica em fase reversa e SephadexTM LH-20 e fazendo uso dos mesmos solventes e seus gradientes de polaridade para a eluição, destacam-se vantagens e desvantagens para ambas as fases estacionárias. A sílica exige preparo mais elaborado, levando várias horas para ficar pronta, enquanto para SephadexTM seu preparo é simples e rápido. A sílica permite aplicar quantidades maiores de amostra, proporcionalmente à quantidade de fase estacionária na coluna; caso haja dificuldades na velocidade de eluição, pode-se ajustar a coluna a uma bomba de vácuo, acelerando o processo. Pelo contrário, grandes massas de SephadexTM dificultam a eluição, tornando o processo lento. Não é aconselhável exercer pressão sobre suas partículas, pois elas se apresentam na forma de gel e a pressão comprime as partículas interrompendo a vazão.

Bons resultados foram obtidos com colunas empacotadas com SephadexTM, sendo que os isômeros do ácido clorogênico eluíram nas primeiras frações, tendo a

água como fase móvel, e os isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos foram recolhidos nas últimas frações, com o metanol.

5.1.1 Isolamento dos extratos em sílica de fase reversa

5.1.1.1 Amostra: grãos verdes do café

A idealização de ensaio com grãos verdes de café teve por finalidade, conseguir o ácido clorogênico em quantidades suficientes para continuidade ao trabalho de pesquisa. A amostra dos grãos de café é tão acessível quanto a de erva mate e contém uma concentração considerável desse ácido.

Utilizando como fase móvel acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água (100:11:11:26), conforme Wagner (1995) e reunindo as frações semelhantes pela análise por CCD, como revelador NP/PEG, tem-se:

- Para a fração Cf-1 - uma mistura complexa com mancha intensa em R_f 0,45;
- Para a fração Cf-1.1 - cinco manchas, duas de alta polaridade, outra em R_f 0,45 e duas menos polares (R_f 0,75 e 0,8);
- Para a fração Cf-1.2 - de odor acentuado, que lembra chocolate, uma mancha intensa em R_f 0,8 com comprimento de onda de 254 nm em câmera de U.V. e mancha suave em R_f 0,45;
- Para a fração Cf-1.3 - intensa mancha em R_f 0,45, com a mistura NP/PEG e com revelador universal manchas fracas, de alta polaridade.

Dentre as frações obtidas do extrato bruto dos grãos verdes do café, cinquenta miligramas do resíduo Cf-1.3 foram dissolvidas em água e aplicadas sobre coluna de sílica de fase reversa. Parte do composto se decompôs por oxidação e 11 mg foram encaminhados para análise em espectrômetro de massas e ressonância magnética nuclear. O produto foi caracterizado como ácido clorogênico.

5.1.1.1.1 Identificação do ácido clorogênico

5.1.1.1.1.1 Espectro na região do infravermelho – I.V.

O espectro no I.V. do ácido clorogênico (FIGURA 13) apresentou uma banda característica de deformação axial de OH de álcool em 3415 cm^{-1} . Em 1637 cm^{-1} , a banda de deformação axial da carbonila e a banda de deformação axial de carbono dupla carbono em 1630 cm^{-1} .

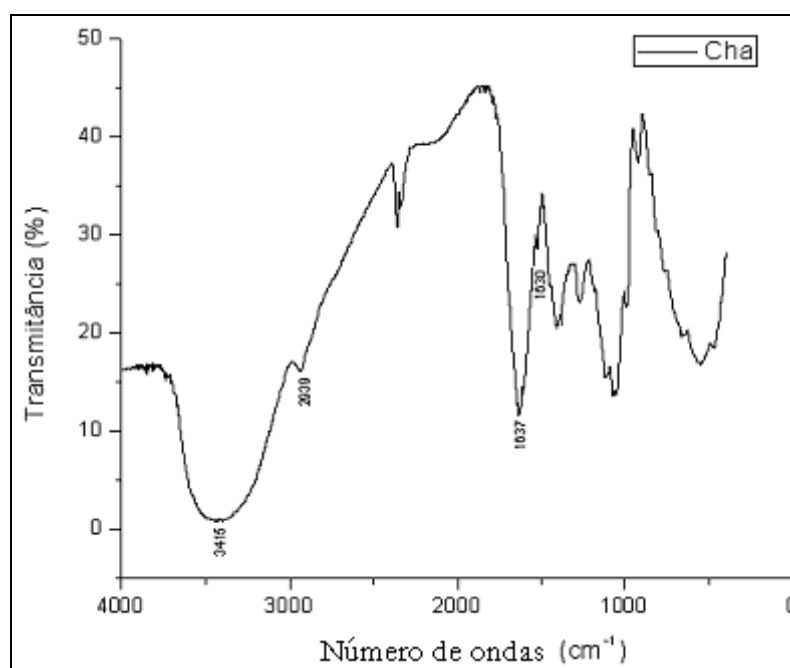


FIGURA 13 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO EM KBr
FONTE: O autor (2008)

5.1.1.1.1.2 Espectro de RMN

Os cinco sinais de hidrogênios do grupo cafeoil são mostrados com suas respectivas integrações na (FIGURA 14), sendo três sinais de hidrogênio de anel aromático e dois de carbonos de dupla ligação. Em 4,81 ppm, pode ser visualizado o sinal característico do solvente, óxido de deutério (D_2O).

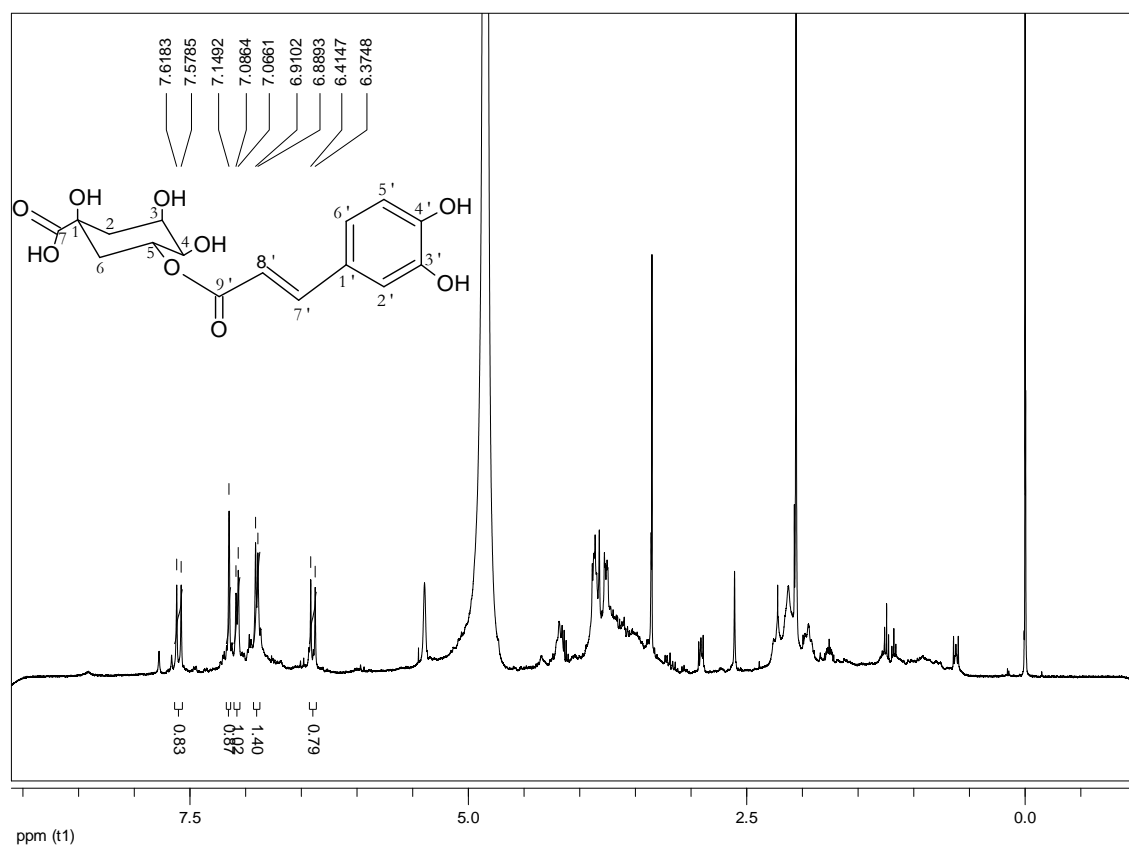


FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE 1H DO ÁCIDO CLOROGÊNICO
FONTE: O autor (2008)

A ampliação da região de δ entre 6,25 e 7,75 ppm do espectro de RMN de ^1H , para a caracterização destes cinco hidrogênios é mostrada na (FIGURA 15). O duplete em 6,39 ppm é referente ao hidrogênio 8', que acopla com o hidrogênio vicinal de carbono de dupla ligação, o hidrogênio 7' com constante de acoplamento de 16,0 Hz. Outro duplete, percebido em 7,60 ppm, devido à maior proximidade com o anel aromático e, conseqüentemente, mais protegido por apresentar menor densidade eletrônica, refere-se ao hidrogênio 7' em acoplamento com o hidrogênio 8' e J 16,0 Hz. Ambos os sinais são típicos de configuração *trans* para os hidrogênios ligados a carbonos insaturados com dupla ligação. Em 6,90 ppm aparece um duplete referente ao acoplamento do hidrogênio 5' do anel aromático em posição *orto* com o hidrogênio 6' e com constante de acoplamento de 8,3 Hz.

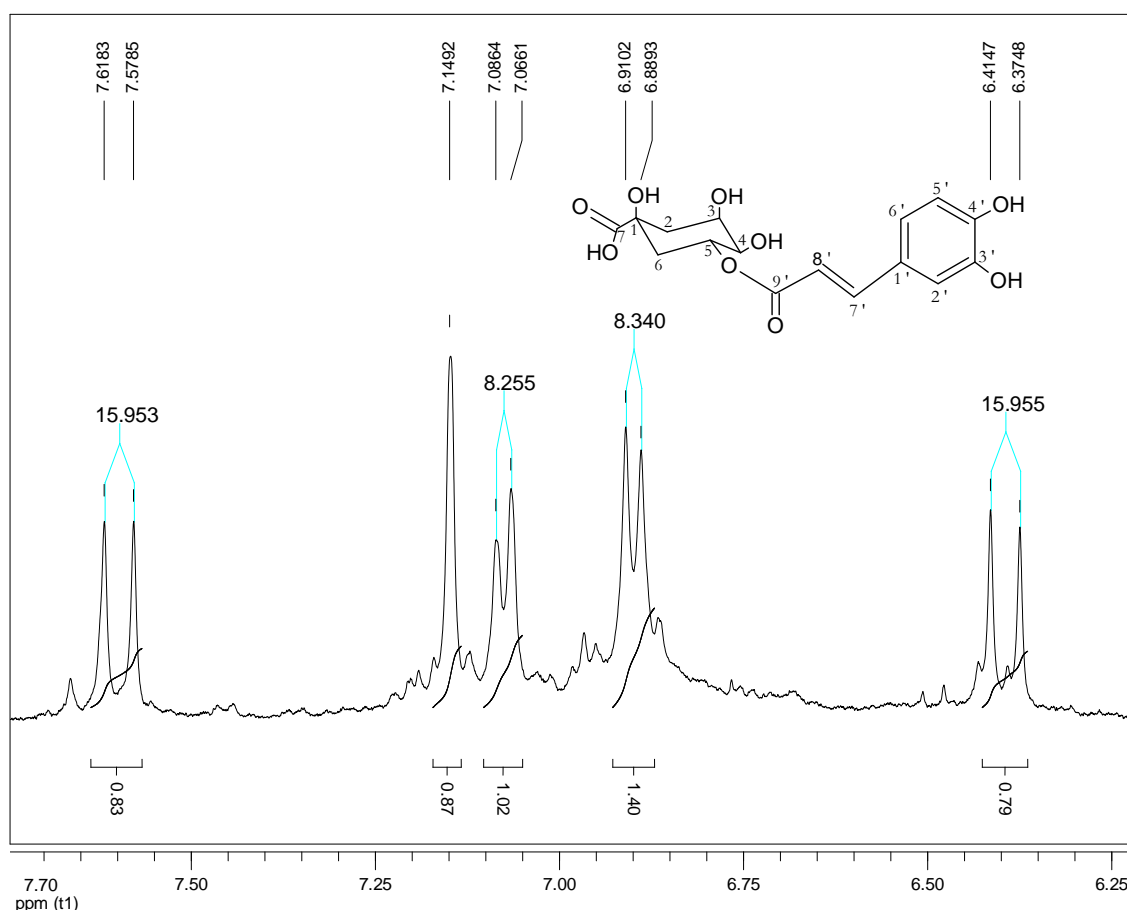


FIGURA 15 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,25 PPM E 7,75 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO CLOROGÊNICO
FONTE: O autor (2008)

O hidrogênio 6' indica um duplete em 7,08 ppm, também com constante de 8,3 Hz e em 7,15 ppm um singleto largo referente a integração para o hidrogênio 2'. Tolonen *et al.* (2002), operando equipamento a 500 MHz, descrevem esse pico com a multiplicidade de um duplete, característico para acoplamentos em posição *meta* dos hidrogênios do anel aromático. Os autores ainda afirmam que a adição de gotas do ácido fórmico não deuterado nas amostras a serem analisadas, deixando o pH da solução entre 2 e 3, permitiria melhor resolução das posições dos grupos cafeoil nos ácidos cafeoilquínicos, pois não ocorreria o rearranjo dos grupos cafeoil no anel.

O espectro de RMN de ^{13}C para o ácido clorogênico (FIGURA 16) revelou sinais da unidade quínica em: 171,8 ppm sinal referente ao carbono sete, uma carboxila; 75,5 ppm sinal do carbono um; 38,4 ppm do carbono dois; 68,6 ppm do carbono três; 76,3 ppm do carbono quatro; 69,4 ppm do carbono cinco e 38,3 ppm do carbono seis. Os sinais de ^{13}C para a unidade cafeica são percebidos em: 149,7 ppm e 148,8 ppm os sinais dos carbonos do grupo fenólico 3' e 4', respectivamente; 146,9 ppm está o sinal do carbono 8'; 125,3 ppm o sinal do carbono 6'; 118,9 ppm o sinal do carbono 5'; 117,8 ppm o sinal do carbono 2' e em 117,6 ppm está o sinal do carbono 7'.

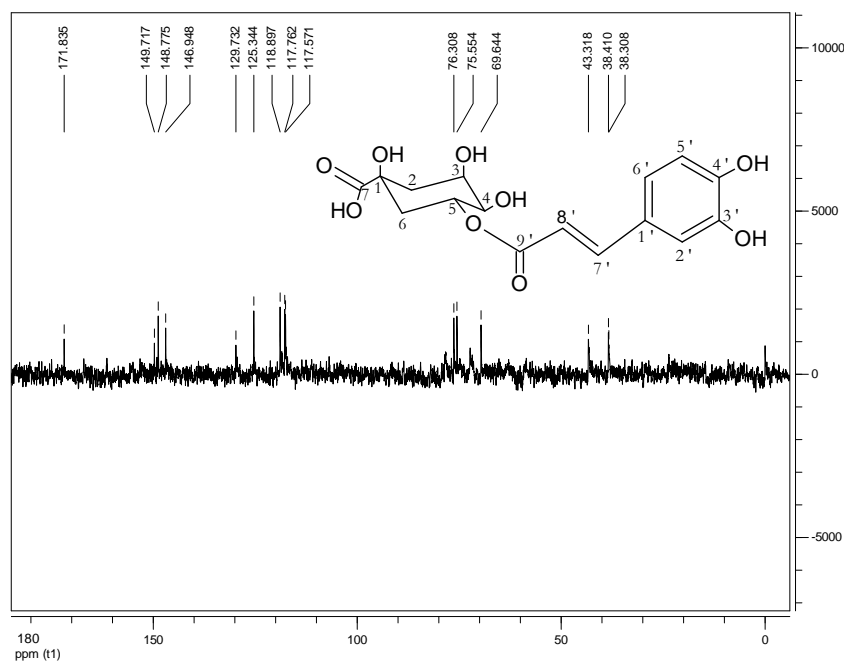


FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ÁCIDO CLOROGÊNICO
FONTE: O autor (2008)

Não foi possível resolver a região dos hidrogênios correspondentes à fração do ácido quínico pertencente a molécula do ácido clorogênico, mas dados da literatura com experimento utilizando o mesmo solvente deuterado, apresentados por Tolonen *et al.* (2002) para ^1H e por Tavares e Ferreira (2006) para ^{13}C , registrados na (TABELA 6), são coincidentes com as informações obtidas para o ácido clorogênico isolado.

TABELA 6 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA A AMOSTRA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

POSIÇÃO	$^{13}\text{C}(\delta)^{a,b}$	$^{13}\text{C}(\delta)^c$	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^c
1	75,5	76,0		
2a _{ax}	38,4	39,0	-	2,09 (1H, dd, 13,77, 9,80)
2e _{eq}			-	4,17 (1H, ddd, 5,28, 3,40, 3,26)
3	69,6	69,3	-	2,15 (1H, ddd, 14,52, 3,40, 1,53)
4	76,3	76,5	-	3,81 (1H, dd, 8,62, 3,26)
5	69,4	71,1	-	5,21 (1H, ddd, 9,80, 8,62, 4,15)
6a	38,3	39,0	-	1,99 (1H, dd, 14,52, 5,28)
6e			-	2,15 (1H, ddd, 14,52, 3,40, 1,53)
7	171,8	179,5		
1'				
2'	117,8	115,7	7,15 s	7,09 (1H, d, 2,17)
3'	149,7	149,0		
4'	148,8	147,2		
5'	118,9	117,0	6,90 (1H, d, 8,3)	6,85 (1H, d, 8,19)
6'	125,3	123,4	7,08 (1H, d, 8,3)	7,02 (1H, dd, 8,19, 2,17)
7'	117,6	115,6	7,60 (1H, d, 16,0)	7,51 (1H, d, 16,18)
8'	146,9	146,8	6,39 (1H, d, 16,0)	6,25 (1H, d, 16,18)
9'				

^a Experimento realizado a 400 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em D_2O , utilizando o TMS como padrão interno; ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C ; ^c Dados da literatura de acordo com TOLONEN *et al.* (2002) (H, 500,13 MHz; C, 125 MHz; D_2O) para ^1H e TAVARES e FERREIRA 2006 (H, 400,13 MHz; C, 100 MHz; gotas de DMSO-d_6) para ^{13}C ; (δ) Deslocamento químico em ppm; * axial; **equatorial.

FONTE: O autor (2008)

5.1.1.1.1.3 Espectro de RMN do ácido cafeico

O ácido cafeico constitui uma das duas partes das moléculas dos ácidos cafeoilquínicos. Com o propósito de comparar seus espectros com sua

correspondente fração nos ácidos clorogênico e neoclorogênico foram adquiridos os espectros de RMN do padrão do ácido cafeico.

Para a obtenção do espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE 1), o ácido cafeico foi dissolvido em metanol- d_4 . Feitas as integrações dos cinco sinais, associados aos cinco hidrogênios da substância, percebe-se que em 3,31 ppm está o quinteto característico do solvente. Todos os cinco sinais estão compreendidos na região do espectro entre 6,00 ppm e 8,00 ppm, por se tratar de hidrogênios de ligação dupla e anel aromático.

Uma ampliação da região de δ entre 6,20 ppm e 7,60 ppm do espectro de RMN de ^1H (APÊNDICE 2) caracteriza os sinais referentes aos hidrogênios da dupla ligação. São dois hidrogênios acoplados com J de 15,87 Hz, típico de acoplamento *trans*. Dentre eles, o hidrogênio do carbono oito apresenta o sinal mais deslocado, em 7,53 ppm. O outro hidrogênio de ligação dupla, ligado ao carbono sete é evidenciado em 6,22 ppm.

Feita ampliação da região de δ entre 6,75 ppm e 7,08 ppm do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 17) para caracterização dos sinais dos três hidrogênios do anel aromático. O hidrogênio dois não possui nenhum acoplamento *orto*. Sua multiplicidade aparece como um duplete simples, em 7,05 ppm, com J de 2,05 Hz, característica de acoplamento *meta* com o hidrogênio seis. O acoplamento *para* com o hidrogênio cinco não foi observado, o que tornaria o sinal um duplo duplete. O sinal do hidrogênio cinco, em 6,78 ppm, apresenta-se como um duplete com J de 8,16 Hz devido ao acoplamento *orto* com o hidrogênio seis. Assim como no caso do hidrogênio dois, o acoplamento *para* não foi evidenciado. Finalmente o hidrogênio seis apresenta um sinal em 6,94 ppm com multiplicidade típica de duplo duplete, suas constantes de acoplamento são de 8,22 Hz, indicando o acoplamento *orto* com o hidrogênio cinco e 2,04 Hz, referente ao acoplamento *meta* com o hidrogênio dois.

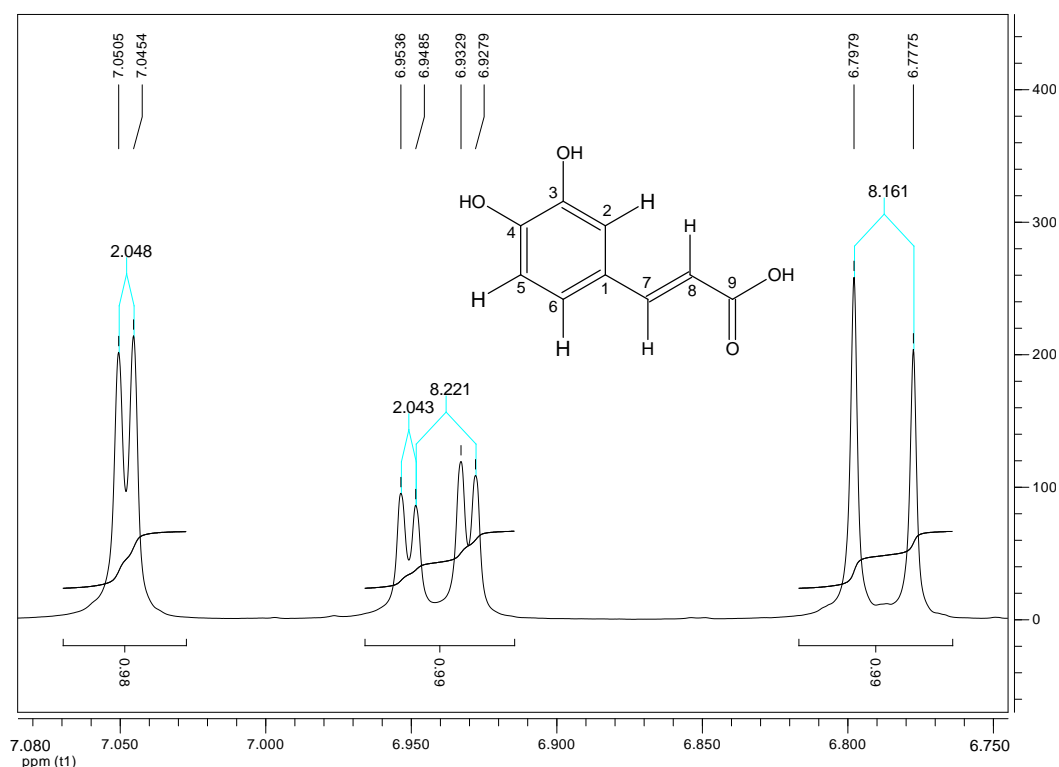


FIGURA 17- AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,75PPM E 7,08PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO CAFEICO

FONTE: O autor (2008)

A fórmula molecular do cafeico é $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$. O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 18) apresentou sinal em 171,12 ppm referente ao carbono nove, uma carboxila. Em 149,44 ppm está o sinal do carbono quatro, em 147,07 ppm o do carbono três, em 146,78 ppm o do carbono oito, em 127,83 ppm o do carbono um, em 122,89 ppm o do carbono seis, em 116,53 ppm o do carbono cinco, em 115,58 ppm o do carbono sete e em 115,14 ppm o do carbono dois.

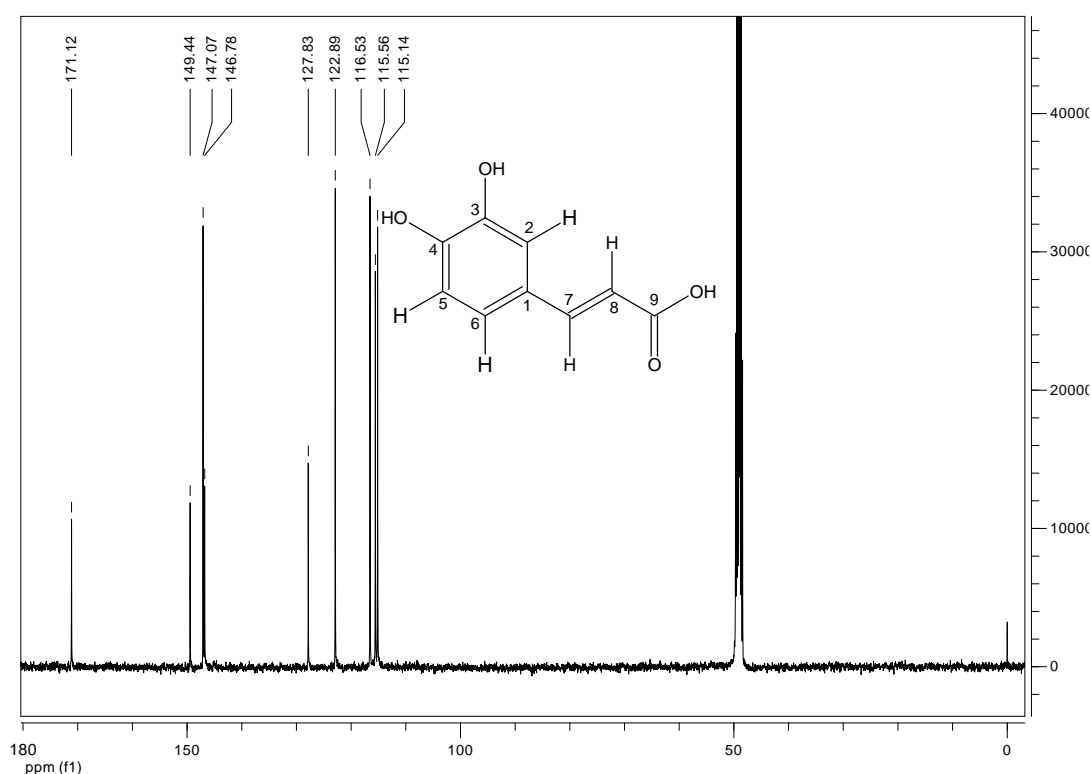


FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ÁCIDO CAFEICO
 FONTE: O autor (2008)

Não foram encontrados relatos na literatura, descrevendo experimento que usasse óxido de deutério como solvente do ácido cafeico; entretanto, os dados apresentados por Tavares e Ferreira (2006) para ^1H e ^{13}C , registrados na (TABELA 7), são coincidentes, inclusive para as constantes de acoplamento dos hidrogênios *trans* da molécula $J_{7,8}$ 15,87 MHz.

TABELA 7 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA O ÁCIDO CAFEICO

POSIÇÃO	$^{13}\text{C}(\delta)^{a,b}$	$^{13}\text{C}(\delta)^c$	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^c
1	127,8	128,0		
2	115,5	115,7	7,0 (1H, d, 2,0)	7,2 (1H, d, 2,6)
3	149,4	149,0	-	-
4	147,0	147,2	-	-
5	116,6	117,0	6,78 (1H, d, 8,1)	6,96 (1H, d, 8,3)
6	122,9	123,4	6,94 (1H, dd, 8,1 ;2,0)	-
7	115,1	115,6	6,22 (1H, d, 15,8)	6,4 (1H, d, 15,8)
8	146,8	146,8	7,53 (1H, d, 15,8)	7,6 (1H, d, 15,8)
9	171,1	170,0		

^a Experimento realizado a 400 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em D_2O , utilizando o TMS como padrão interno; ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C ; ^c Dados da literatura de acordo com TAVARES e FERREIRA 2006 (H, 400,13 MHz; C, 100 MHz; gotas de DMSO-d_6) para ^1H e para ^{13}C ; (δ) Deslocamento químico em ppm.

FONTE: O autor (2008)

5.1.1.2 Amostra: erva mate comercial

Como resultado do fracionamento da amostra de erva mate em sílica de fase reversa foram obtidas 22 frações, recolhidas em tubos de ensaio numerados (descartado o volume morto). As frações 1 e 2; de 3 a 11; de 12 a 17 e de 18 a 22, foram reunidas por semelhanças em seus perfis cromatográficos.

As frações 1 e 2 do extrato bruto da erva mate, recolhidas da coluna de sílica PC-18 e de R_f 0,4 em análise por CCD, foram reunidas e depois de terem sido concentradas em evaporador rotatório, resultaram em 58 mg de um composto avaliado por CLAE com coluna C-18 de 5 μ m de tamanho de partícula, usando como fase móvel metanol/água (23:77), com detecção UV em 330 nm e caracterizado como sendo a mistura dos isômeros do ácido clorogênico.

A escolha da fase móvel baseou-se na melhor resolução do pico do analito com o menor tempo de retenção, obtido por Leal (2006), durante otimização das condições ideais para quantificação do ácido clorogênico extraído da planta *Cynara scolymus*, conhecida popularmente como alcachofra.

5.1.1.2.1 Identificação dos isômeros do ácido clorogênico

O cromatograma obtido revela em tempos de retenção de 3,5; 6,5 e 7,5 o perfil cromatográfico da mistura de três compostos (FIGURA 19). Esses se apresentam, inclusive, com o mesmo perfil em UV. A verificação no espectrômetro de massas, 353,2 Da, no modo negativo EM1, confirma tratar-se de uma mistura de compostos de mesma massa molecular, isômeros entre si. Por analogia aos tempos de retenção com o padrão do ácido clorogênico, já caracterizado em condições similares de equipamento e utilizando a mesma fase móvel, conclui-se que se trata de uma mistura de isômeros do ácido clorogênico. Quanto aos diferentes tempos de retenção no cromatograma obtido por CLAE, sabe-se que pequenas modificações

na molécula, como a posição de algum átomo, ou conjunto de átomos na estrutura conformacional, seriam suficientes para impedir a sobreposição dos picos cromatográficos. Portanto, analisando as estruturas dos isômeros do ácido clorogênico, a junção da molécula de ácido caféico a OH em posição axial do ácido quínico, para o ácido neoclorogênico e em posição equatorial para os ácidos clorogênico e criptoclorogênico, justificariam os diferentes tempos.

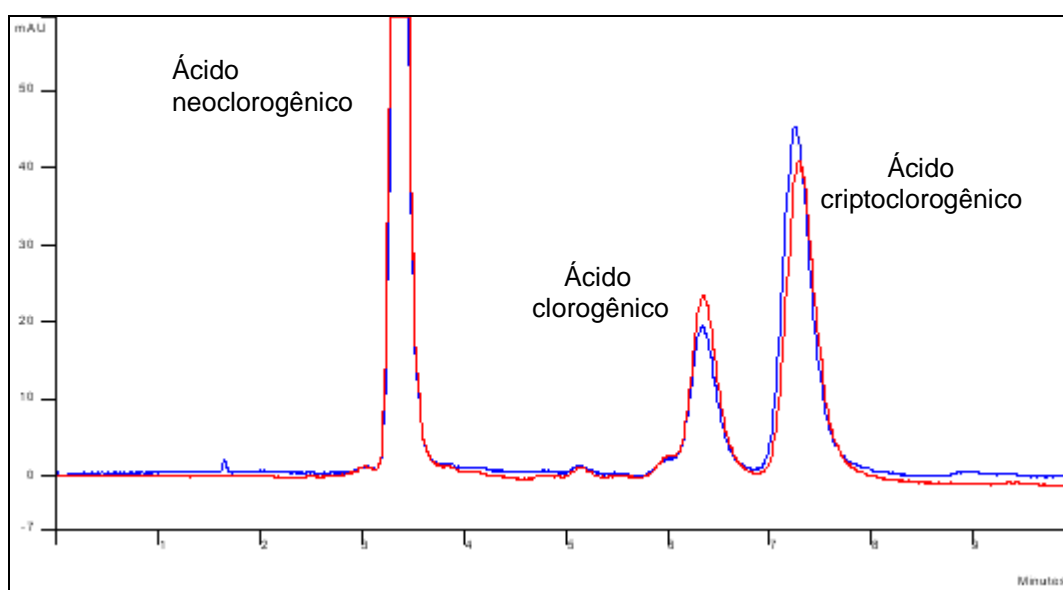


FIGURA 19 - CROMATOGRAMAS DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO ISOLADOS DA AMOSTRA DE ERVA MATE

FONTE: O autor (2008)

Dois cromatogramas podem ser visualizados, azul e vermelho, resultantes da coeluição do produto obtido em repetidos experimentos com a sílica de fase reversa.

Os espectros de UV do padrão de ácido clorogênico, comparado ao espectro do ácido clorogênico integrante da mistura de isômeros isolados da amostra de erva mate, por comparação, são correspondentes (FIGURA 20), inclusive em banda de absorção em 300 nm e absorção máxima em 325 nm. Com isto, confirma-se a identidade do ácido clorogênico e dos seus isômeros.

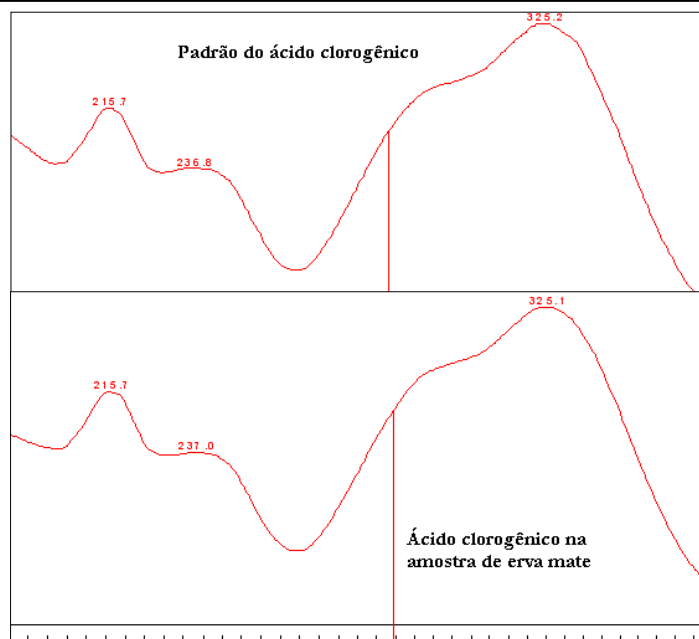


FIGURA 20 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO ÁCIDO CLOROGÊNICO PADRÃO E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NA AMOSTRA DE ERVA-MATE

FONTE: O autor (2008)

Considerando, ainda, o fracionamento do extrato bruto de erva mate em sílica de fase reversa, as frações de 18 a 22, com R_f de 0,8, resultaram em aproximadamente 26 mg de um composto que confirmou ser da mistura de isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos, cujas características somente serão descritas a partir do isolamento em coluna de SephadexTM, por ter apresentado melhores resultados na reprodução do experimento.

5.1.2 Fracionamento do extrato em SephadexTM

Embora a maior dificuldade de trabalho, utilizando a SephadexTM para o isolamento de compostos polares do extrato bruto da erva mate, esteja relacionada ao tempo de eluição do solvente para compor as frações, os melhores resultados foram obtidos com esta fase estacionária, que se mostrou mais eficiente e permitiu repetibilidade.

Ao ser aplicada em SephadexTM uma nova alíquota de extrato bruto de erva mate, com gradiente de polaridade água, água/metanol (3:1; 1:1; e 1:3) e metanol puro, resultou em quatorze frações recolhidas em tubos de ensaio numerados, com volumes próximos a 10 mL (descartado o volume morto). As frações 1 e 2; de 3 a 5; de 6 a 10 e 11 a 14 foram reunidas, por semelhanças em seus perfis cromatográficos, revelados por CCD.

As frações 1 e 2, com uma única mancha em R_f 0,40, foram concentradas em evaporador rotatório e forneceram 9,8 mg de um composto que após análise, em CLAE, revelaram cromatograma de perfil semelhante ao apresentado na (FIGURA 19), identificado como sendo dos isômeros do ácido clorogênico.

Esta massa de 9,8 mg foi aplicada em coluna de SephadexTM, utilizando como fase móvel água e resultadou em 7 mg de um composto sólido. Encaminhado para análise estrutural, revelou ser o ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ou ácido neoclorogênico, um dos isômeros do ácido clorogênico.

5.1.2.1.1 Identificação do ácido neoclorogênico

5.1.2.1.1.1 Espectro na região do infravermelho

O espectro na região do I.V. do ácido neoclorogênico (FIGURA 21) apresentou uma banda característica de deformação axial de OH em 3400 cm^{-1} . Em 1691 cm^{-1} , a banda de deformação axial da carbonila e a banda de deformação axial de carbono dupla carbono em 1604 cm^{-1} .

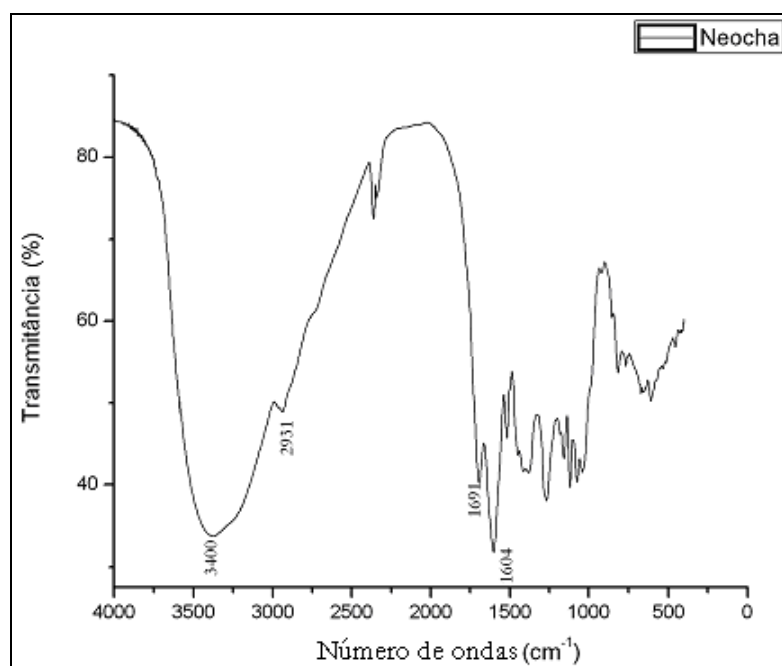


FIGURA 21 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO NEOCLOGRÊNICO EM KBr

FONTE: O autor (2008)

Buscando ainda confirmar a estrutura do composto, a aquisição do espectro de ultravioleta, com uma banda de absorção máxima em 325 nm, característica dos isômeros do ácido clorogênico (FIGURA 20) e a identificação de menor tempo de retenção entre os isômeros na CLAE (FIGURA 19), reforçaram a hipótese de que o composto em questão é o ácido neoclorogênico, necessitando informações complementares que certamente o identificassem.

5.1.2.1.1.2 Espectro de massas

A análise do composto obtido pela coluna de Sephadex™ acusou massa molecular, no espectrômetro de massas, de 353,2 Da, no modo negativo $[M-H]^-$ (FIGURA 22). Este valor coincide com o valor teórico atribuído à fórmula molecular do ácido neoclorogênico e com o valor de massa molecular do seu isômero, o ácido

clorogênico, constituídos por uma unidade do ácido quínico esterificada com uma de ácido caféico e representados pela fórmula molecular ($C_{16}H_{18}O_9$).

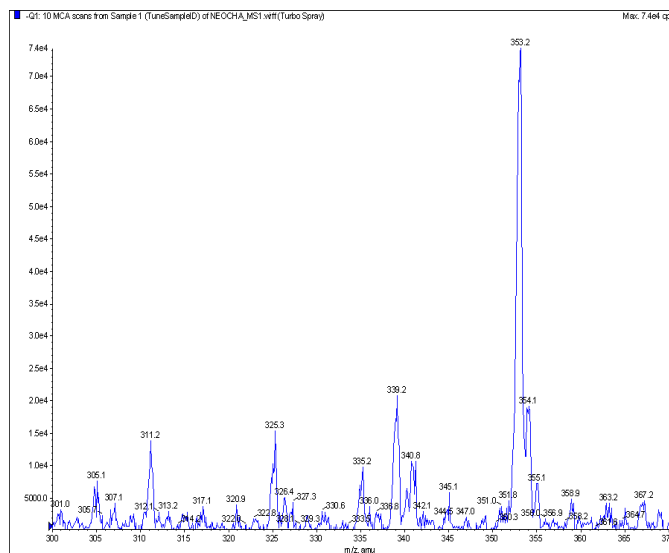


FIGURA 22 - ESPECTRO DE MASSAS (EM1), NO MODO NEGATIVO PARA O ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO
FONTE: O autor (2008)

Selecionado o íon molecular, ou precursor, no primeiro quadrupolo (EM1), a fragmentação nos íons produto - modo EM2 (FIGURA 23) ocorrerá, no segundo quadrupolo. O perfil de fragmentação para o composto revela os íons m/z 135,1 Da, m/z 172,9 Da, m/z 179,0 Da e m/z 191,1 Da.

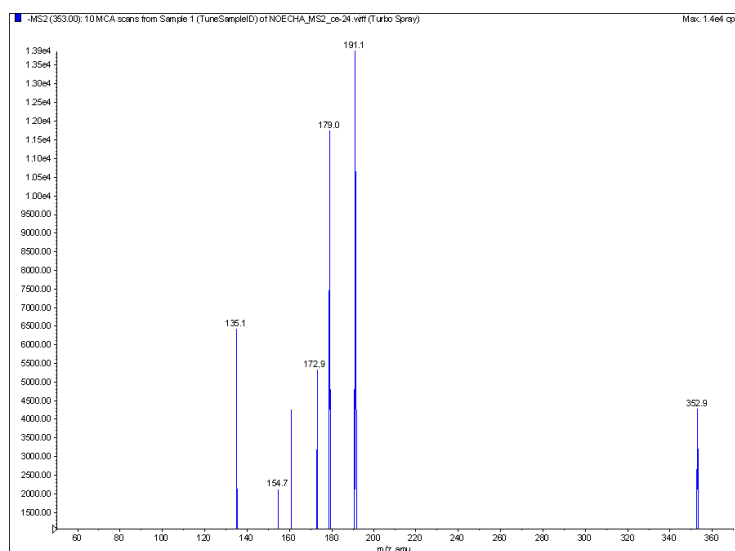


FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSAS (EM2), MODO NEGATIVO, DO ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO
FONTE: O autor (2008)

O modo EM2 monitora a passagem dos íons selecionados e gerados na fragmentação do íon molecular, selecionado no primeiro quadrupolo, garantindo que seja realmente do composto de interesse.

Como proposta, os fragmentos gerados a partir do precursor, têm no espectro EM/EM seus íons resultante da cisão das unidades formadoras do ácido neoclorogênico (FIGURA 24). O íon produto m/z 191,1 Da está relacionado ao íon quinato [unidade quínica-H]⁻ e m/z 172,9 Da, o íon resultante da perda de água da unidade quínica [unidade quínica-H₂O-H]⁻, com duas formas possíveis de ressonância, em função da dupla ligação do ciclo. Em especial, estes dois fragmentos foram escolhidos como quantificadores, por representarem o maior percentual quantitativo entre os íons obtidos, justificado pela maior estabilidade de suas estruturas.

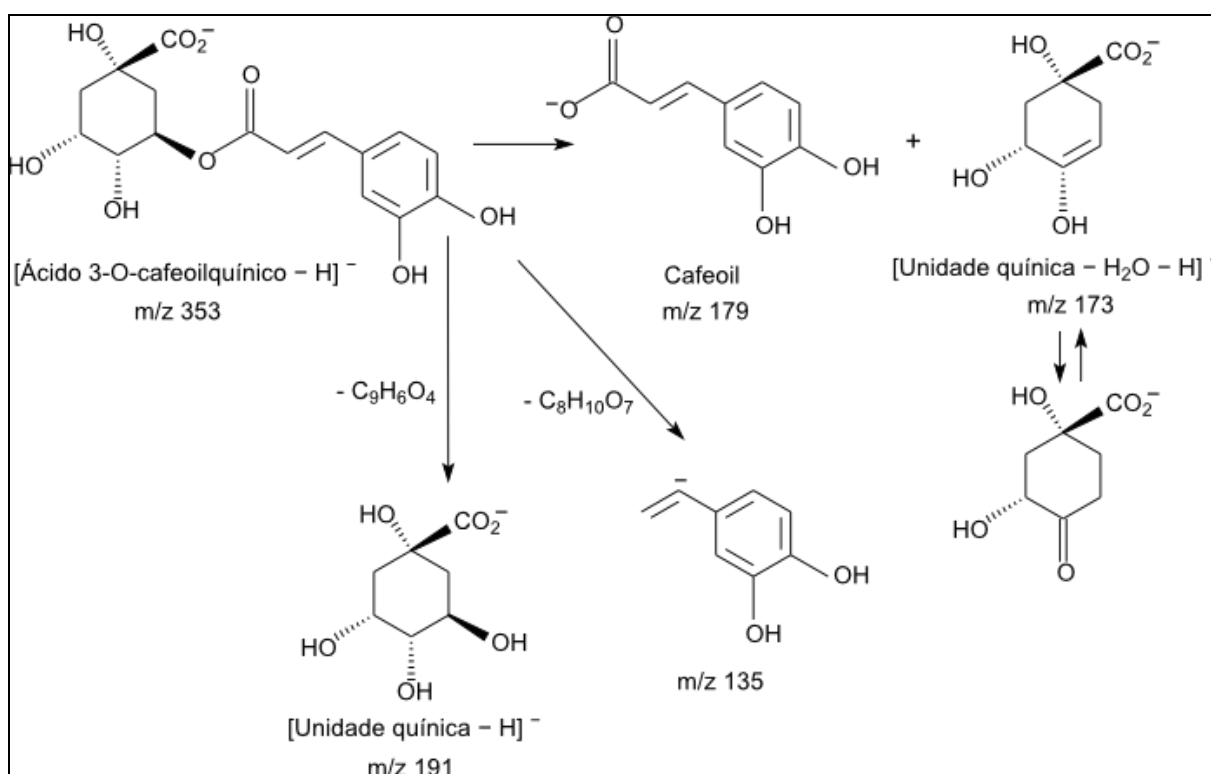


FIGURA 24 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO
FONTE: Modificado pelo autor (2008)

A fragmentação da unidade do ácido cafeico produz o íon m/z 179,0 Da, correspondente ao íon cafeoil [unidade cafeica-H]⁻ e o íon m/z 135,1 Da, formado pela perda de gás carbônico da unidade cafeica [unidade cafeica-CO₂-H]⁻.

A análise das informações obtidas para a elucidação da estrutura do composto, reunidas através dos espectros e cromatogramas, garantem que a fração pura e isolada por coluna de SephadexTM do extrato bruto de erva mate, corresponde ao ácido 3-*O*-cafeoilquínico, o ácido neoclorogênico.

5.1.2.1.2 Identificação dos isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos

As frações correspondentes aos tubos de ensaio, numerados de 11 a 14, com R_f 0,8 em análise por CCD, obtidas do extrato bruto da erva mate aplicado em coluna de SephadexTM, revelaram uma mistura de dois compostos, supostamente dos isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos. Tentativas foram feitas na intenção de separar a mistura obtida neste processo, entre eles, coluna de fase reversa PC18, Cromatotron[®] e até mesmo a coluna de SephadexTM. O maior desafio, entretanto, esteve na dificuldade em concentrar os produtos fracionados, pois os compostos escurecem rapidamente à medida que o solvente é retirado e, como a massa isolada é pequena, a perda pode ser considerável. Em alguns ensaios criou-se um mecanismo de atmosfera inerte, com os frascos mantidos em saco plástico fechado com corrente de nitrogênio. Como havia necessidade de eliminar o solvente da amostra, o método não foi adequado; entretanto, esse artifício resultou como um procedimento eficiente na filtração dos insolúveis do café, preservando os componentes sólidos da rápida oxidação pelo ar.

O fato de a fase móvel conter água e em alguns casos ácido acético, dificulta a obtenção do resíduo seco sem grandes agressões ao composto (altas temperaturas ou exposição ao oxigênio do ar). Mesmo assim, 10,3 mg do sólido obtido destas frações foram encaminhados para análise estrutural.

5.1.2.1.2.1 Espectro na região do infravermelho

O espectro no I.V. da suposta mistura dos isômeros do ácido dicafeoilquínico (FIGURA 25) apresentou uma banda característica de deformação axial de OH em 3423 cm^{-1} , em 1699 cm^{-1} , a banda de deformação axial da carbonila e a banda de deformação axial de carbono dupla carbono em 1629 cm^{-1} .

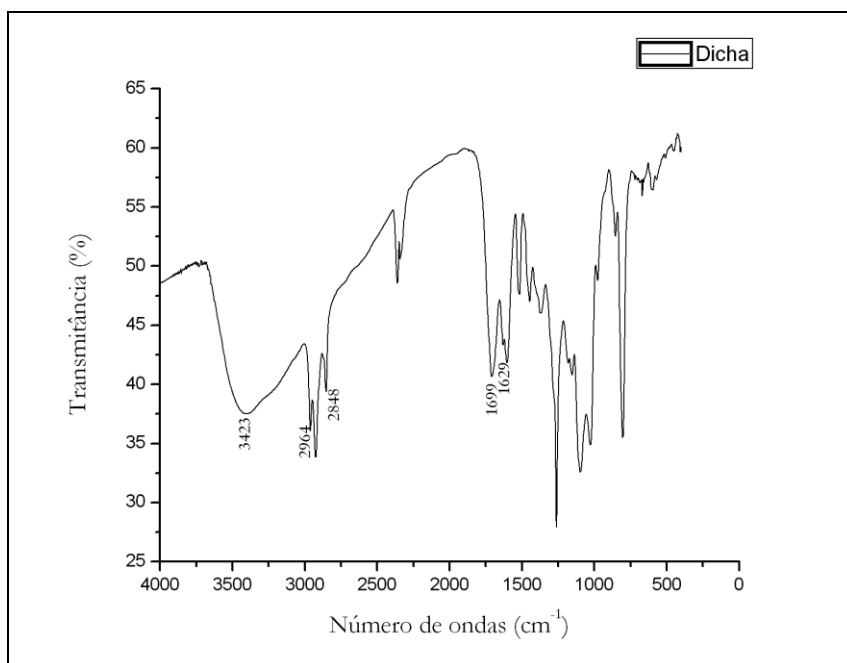


FIGURA 25 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO
ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO EM KBr
FONTE: O autor (2008)

5.1.2.1.2.2 Espectro de RMN

Para o espectro de ressonância magnética do hipotético composto, eram esperados dezessete sinais: sete referentes à estrutura do ácido quínico e dez referentes aos dois grupos do cafeico na molécula; entretanto, a região dos hidrogênios do ácido quínico, mostrou-se inadequada, em resolução, para avaliação.

Os dez sinais de hidrogênios dos cafeicos são mostrados com suas respectivas integrações. Desses, seis são de anel aromático e quatro de carbonos de dupla ligação, todos mais deslocados. Em 4,90 ppm o sinal característico do solvente, metanol- d_4 com gotas de óxido de deutério (D_2O) (FIGURA 26).

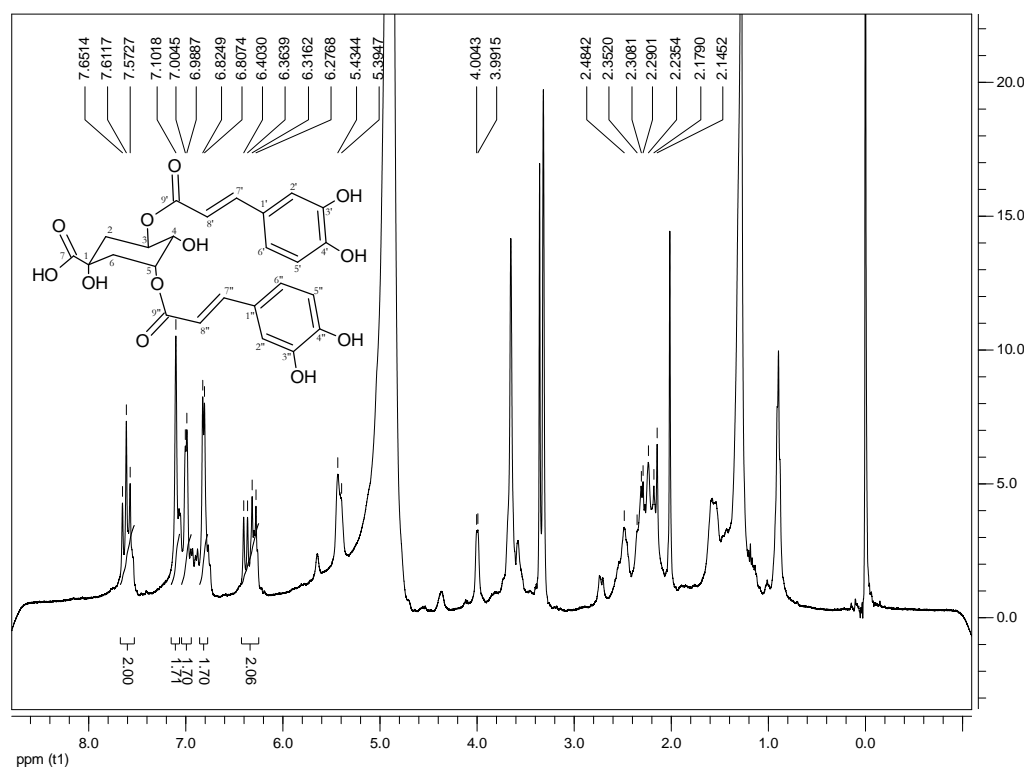


FIGURA 26 - ESPECTRO DE RMN DE 1H DA MISTURA DE ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS
FONTE: O autor (2008)

Uma ampliação da região de δ entre 6,19 e 6,45 ppm do espectro de RMN de 1H , para a caracterização de dois destes hidrogênios é mostrada na (FIGURA 27). O duplete em 6,30 ppm, com constante de acoplamento de 15,8 Hz, é referente ao hidrogênio 8'', que acopla com o hidrogênio vicinal de carbono de dupla ligação, o hidrogênio 7''. Em 6,38 ppm aparece um duplete referente ao acoplamento do hidrogênio 8' com o hidrogênio vicinal de carbono de dupla ligação, o hidrogênio 7', com constante de acoplamento de 15,7 Hz.

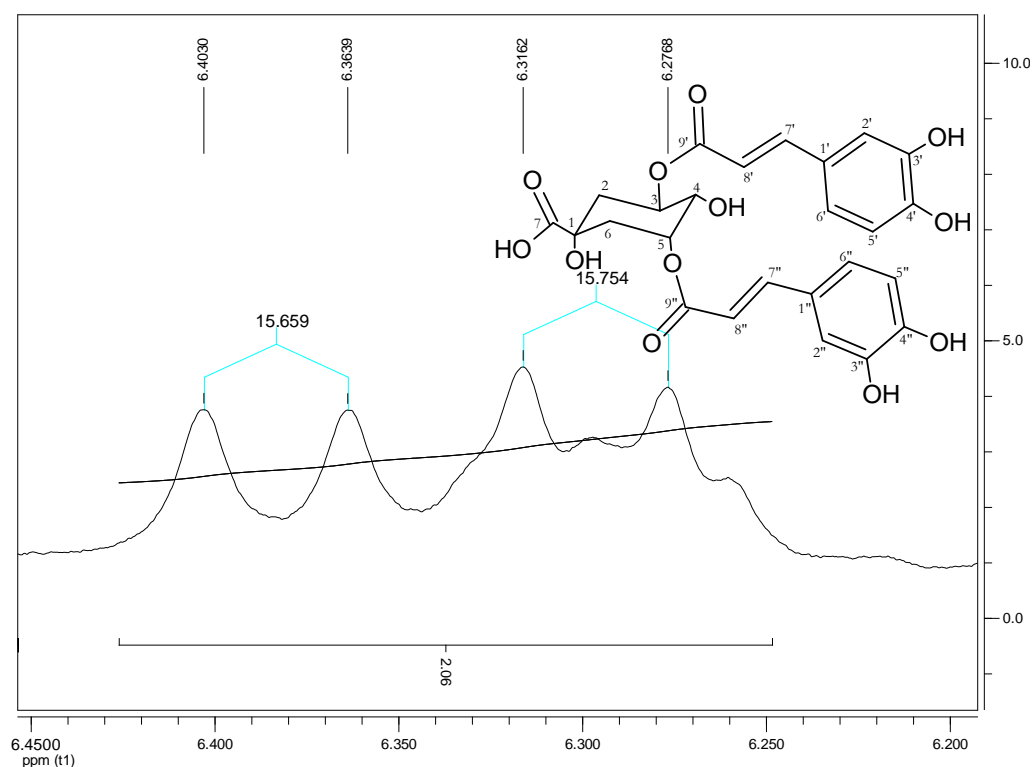


FIGURA 27 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,20 PPM E 6,45 PPM DA MISTURA DE ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFOILQUÍNICOS
FONTE: O autor (2008)

A ampliação da região de δ entre 6,72 e 7,16 ppm do espectro de RMN de ^1H , é mostrada na (FIGURA 28). Em 6,82 ppm, um duplete referente ao acoplamento do hidrogênio 5'' do anel aromático em posição *orto* com o hidrogênio 6'', com constante de acoplamento de 7,00 Hz. O H-6'' por sua vez indica também um duplete em 6,99 ppm, com constante de acoplamento de 6,32 Hz. Esses sinais mostram integração para dois hidrogênios em cada um dos deslocamentos apresentados, o que revela a sobreposição de sinais com os hidrogênios 5' e 6', respectivamente. Em 7,10 ppm um singleto largo que mostra a integração para dois hidrogênio, o 2' em sobreposição com o sinal do hidrogênio 2''. Chuda *et al.* (1996), analisando um ácido dicafeoilquínico com equipamento de 600,05 MHz, identificou um duplete, sem sobreposição de sinais, para esses dois hidrogênios, em 7,138 ppm e 7,148 ppm, ambos com J de 2,1 Hz.

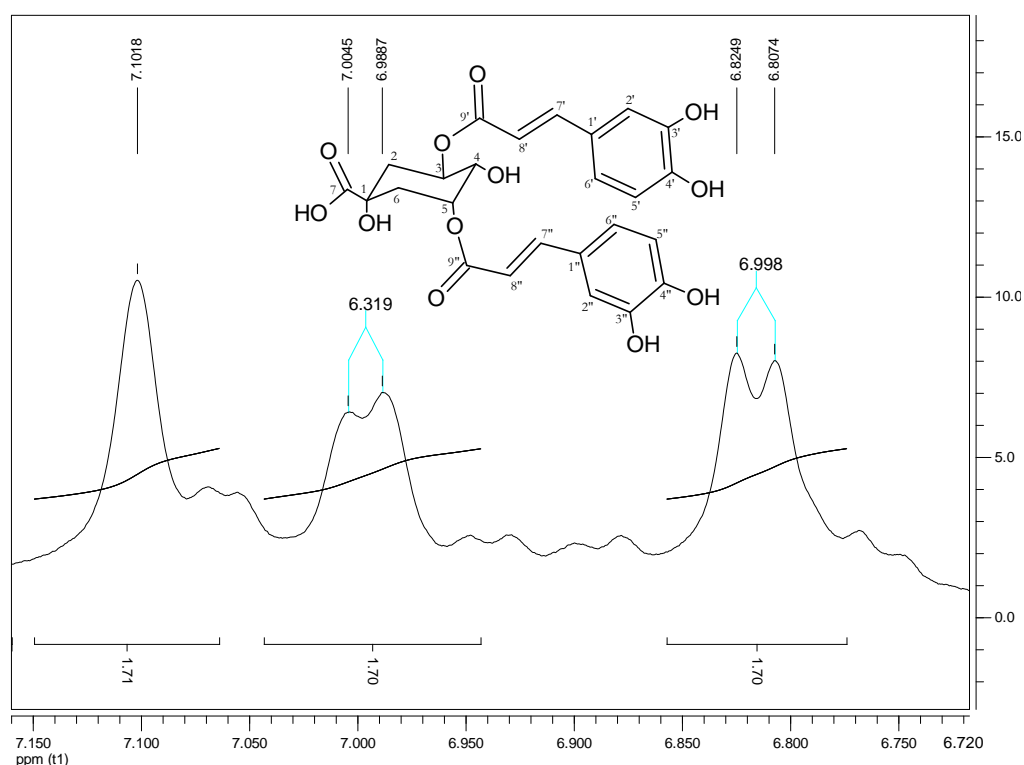


FIGURA 28 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,72 PPM E 7,15 PPM DA MISTURA DE ISÔMEROS DOS ÁCIDOS DICAFFEOILQUÍNICOS

FONTE: O autor (2008)

A (FIGURA 29), mostra a ampliação da região entre 7,52 e 7,70 ppm. Um duplete, mais deslocado devido à maior proximidade com o anel aromático, que aparece em 7,59 ppm para o hidrogênio 7'' e com constante de acoplamento 15,6 Hz, é típico de configuração *trans* para os hidrogênios ligados a carbonos insaturados com dupla ligação do grupo cafeico. Um outro duplete em 7,63 ppm, para o hidrogênio 7', mantém constante de acoplamento de 15,9 Hz, referente a configuração *trans* para os hidrogênios ligados a carbonos insaturados com dupla ligação do segundo grupo cafeico.

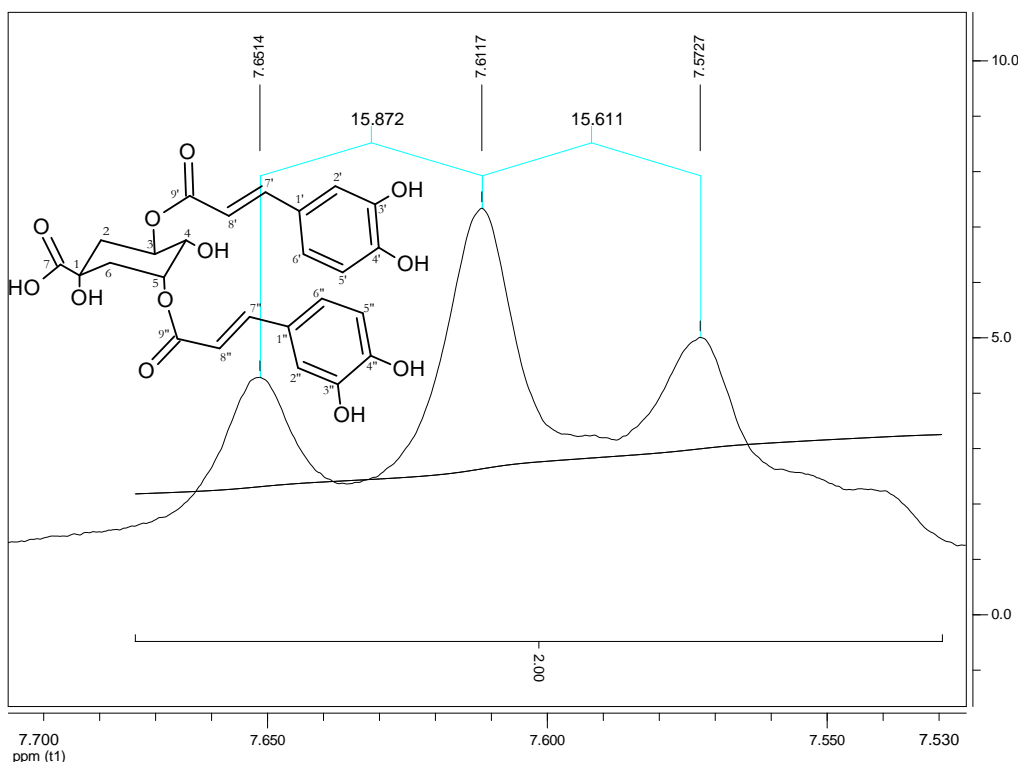


FIGURA 29 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 7,52 PPM E 7,70 PPM DA MISTURA DE ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFAEILQUÍNICO
FONTE: O autor (2008)

Dados de ^{13}C não foram obtidos para este composto e quando comparandos os deslocamentos obtidos para ^1H com as informações apresentadas por Chuda *et al.* (1996) para ^1H , registrados na (TABELA 8), percebe-se que os valores são próximos. As diferenças experimentais residem no equipamento e no solvente utilizados pelo autor, que adquiriu seus espectros a 600 MHz, utilizando acetona deuterada. Embora a tabela apresente apenas os sinais obtidos para as duas frações do ácido cafeico presentes na molécula dos isômeros do ácido dicafeoilquínico, pois não foi possível resolver a parte dos espectros de RMN correspondente a fração do ácido quínico, e considerando fato de que os sinais referem-se a uma mistura de dois compostos, pode-se afirmar que é segura a interpretação dada aos sinais que indicam ser do composto pretendido, ainda restando a confirmação por análise em espectrômetro de massas.

TABELA 8 – DADOS DE RMN DE ^1H PARA OS ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO

POSIÇÃO	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b
2'	Sobreposição 2"	7,138 (d, 2,1)
5'	Sobreposição 5"	6,863 (d, 8,2)
6'	Sobreposição 6"	Sobreposição 6"
7'	7,63 (d, 15,9)	7,544 (d, 16,0)
8'	6,38 (d, 15,7)	6,234 (d, 16,0)
5"	6,82 (d, 7,00)	6,865 (d, 8,2)
6"	6,99 (d, 6,32)	7,023 (d, 8,2)
7"	7,59 (d, 15,6)	7,571 (d, 16,9)
8"	6,30 (d, 15,8)	6,306 (d, 16,9)

^a Experimento realizado pelo autor a 400 MHz para ^1H em metanol- d_4 com gotas de D_2O , utilizando o TMS como padrão interno; ^b Dados da literatura de acordo com CHUDA *et al.* (1996) (^1H , 600,05 MHz; acetona deuterada) para ^1H ; (δ) Deslocamento químico em ppm.

FONTE: O autor (2008)

5.1.2.1.2.3 Espectro de massas

Os isômeros do ácido dicafeoilquínico, constituídos por uma unidade do ácido quínico esterificada com duas unidades do ácido cafeico e com fórmula molecular ($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$), revelaram espectro EM/EM do íon precursor m/z 515,3 Da, $[\text{M}-\text{H}]^-$ (FIGURA 30), resultado que confirma os valores teóricos atribuídos à fórmula molecular do ácido dicafeoilquínico.

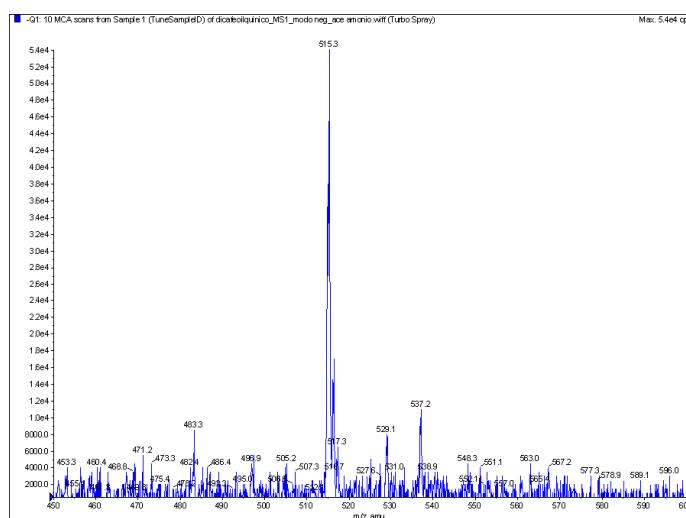


FIGURA 30 - ESPECTRO DE MASSAS (EM1), EM MODO NEGATIVO, DA MISTURA DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO

FONTE: O autor (2008)

Como padrão de fragmentação característico, originados através da energia de colisão de -26 V para o composto em análise identificou-se a perda da unidade de cafeoil quinato m/z 353,1 Da e da unidade quínica m/z 191,1 Da, cuja proposta de fregmentação é apresentada na (FIGURA 31). Deve-se levar em consideração que a elucidação da estrutura não partiu das frações purificadas e sim de uma mistura de dois compostos identificados por diferenças nos tempos de retenção na CLAE; fato que permite concluir que se trata de dois compostos, porém com mesma massa molecular, permitindo caracterizá-los como isômeros do ácido dicafeoilquínico.

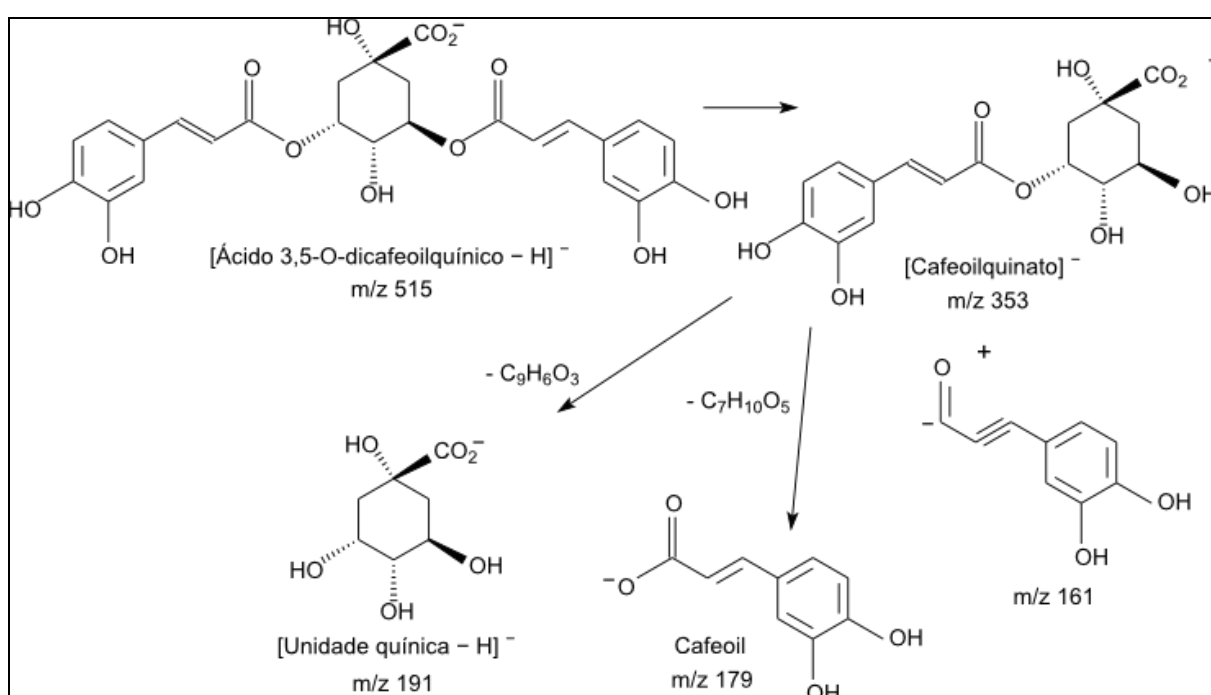


FIGURA 31 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA OS ISÔMEROS DO ÁCIDO DICAFOILQUÍNICO

FONTE: Modificado pelo autor (2008)

5.2 OBTENÇÃO DA QUINIDA

Indisponível para compra, esta γ -lactona do ácido quínico tem sua investigação centralizada nos grãos tostados do café, sendo o produto de uma das

vias possíveis durante o processamento. Acredita-se que esses compostos contribuem com o sabor amargo dos grãos e são responsáveis por indiscutíveis atividades biológicas, como por exemplo, reforço da ação da insulina. São recentes as pesquisas das lactonas dos cafeoil e dicafeoil químicos. Até o momento não foram encontrados dados na literatura sobre sua presença nas folhas tostadas da erva mate.

5.2.1 Reação de obtenção da quinida

A reação de esterificação intramolecular entre a carboxila do C-1 com a hidroxila do C-5 do ácido quínico, conduzem à formação desta γ -lactona bicíclica (FIGURA 32), deixando livres as hidroxilas em C-1, C-3 e C-4 (BARCO *et al.*, 1997).

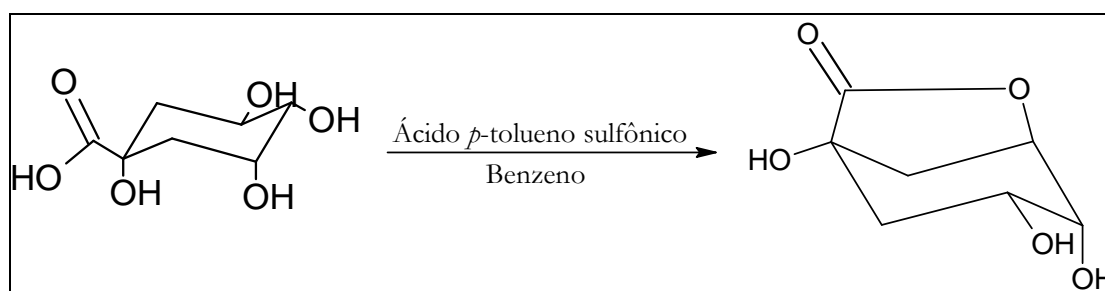


FIGURA 32 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA REAÇÃO DE OBTENÇÃO DA QUINIDA
FONTE: O autor (2008)

Ao produzir a quinida, Vandewalle (*apud* BARCO, 1997) alcançou 96% de rendimento utilizando tolueno na presença do ácido *p*-tolueno sulfônico, ao passo que Evans (2002) obteve 86% em meio ao benzeno e ainda garantiu a utilização deste composto sem prévia purificação. Esses resultados foram melhores do que os 63% registrados neste experimento.

O perfil cromatográfico, obtido por CCD, do composto de R_f 0,35, coincide com o padrão do ácido quínico; enquanto o outro, de R_f 0,42, indica ser de composto menos polar, fornecendo, após recristalização, 63 mg de cristais da quinida, proporcionais a uma massa de partida de 100 mg do ácido quínico.

Neste experimento, valores ainda maiores poderiam ser obtidos na massa do produto, caso fosse utilizado benzeno seco, assim considerado quando seu conteúdo de água não ultrapassar 0,005%. Embora o benzeno comercial tenha sido destilado por duas vezes antes de sua utilização, não foi mantido, em presença do sódio metálico, o que facilitaria a remoção da água residual. Esta possibilita ao sistema promover a inversão da reação e, conseqüentemente, reduzir seu rendimento (LENZ, 2003).

5.2.2 Identificação do ácido quínico

A identificação do ácido quínico através das análises na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear e no espectrômetro de massas, serve como referência para comparação com a quinida e com os ácidos cafeoilquínicos.

5.2.2.1.1.1 Espectro na região do infravermelho

O espectro no I.V. para o ácido quínico (FIGURA 33) apresentou uma banda característica de deformação axial de OH livre em 3522 e 3394 cm^{-1} . Em 2500 cm^{-1} estiramento largo de OH de ácido carboxílico e em 1698 cm^{-1} a banda de deformação axial da carbonila.

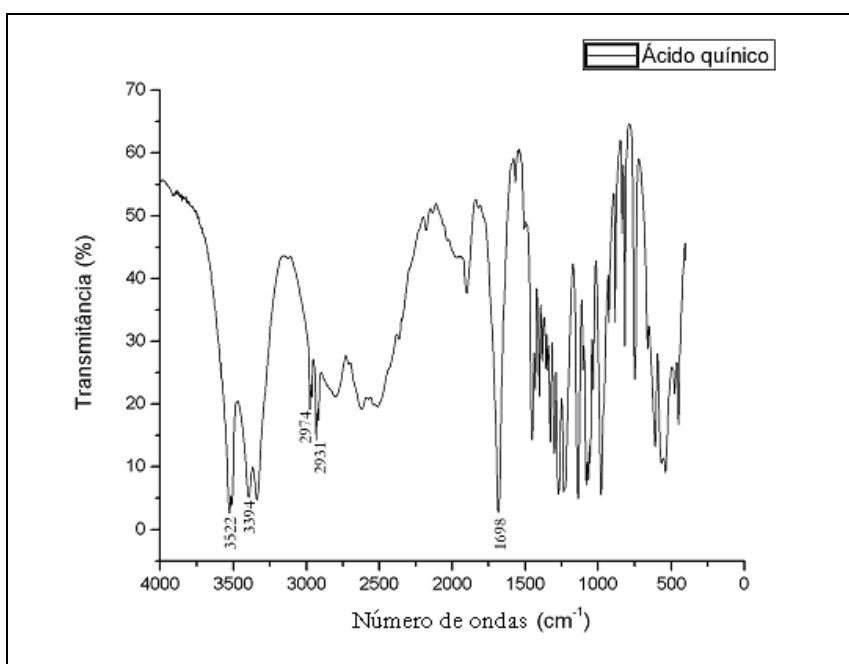


FIGURA 33 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ÁCIDO QUÍNICO EM KBr

FONTE: O autor (2008)

5.2.2.1.1.2 Espectro de RMN

O espectro de RMN de ^1H foi adquirido com o ácido quínico dissolvido em metanol- d_4 . Os sinais referentes aos sete hidrogênios da substância estão mostrados com suas respectivas integrações na (FIGURA 34). Em 3,31 ppm está o quinteto referente ao solvente. Quatro hidrogênios (2a, 2e, 6a e 6e) estão mais protegidos e, conseqüentemente, com menores deslocamentos.

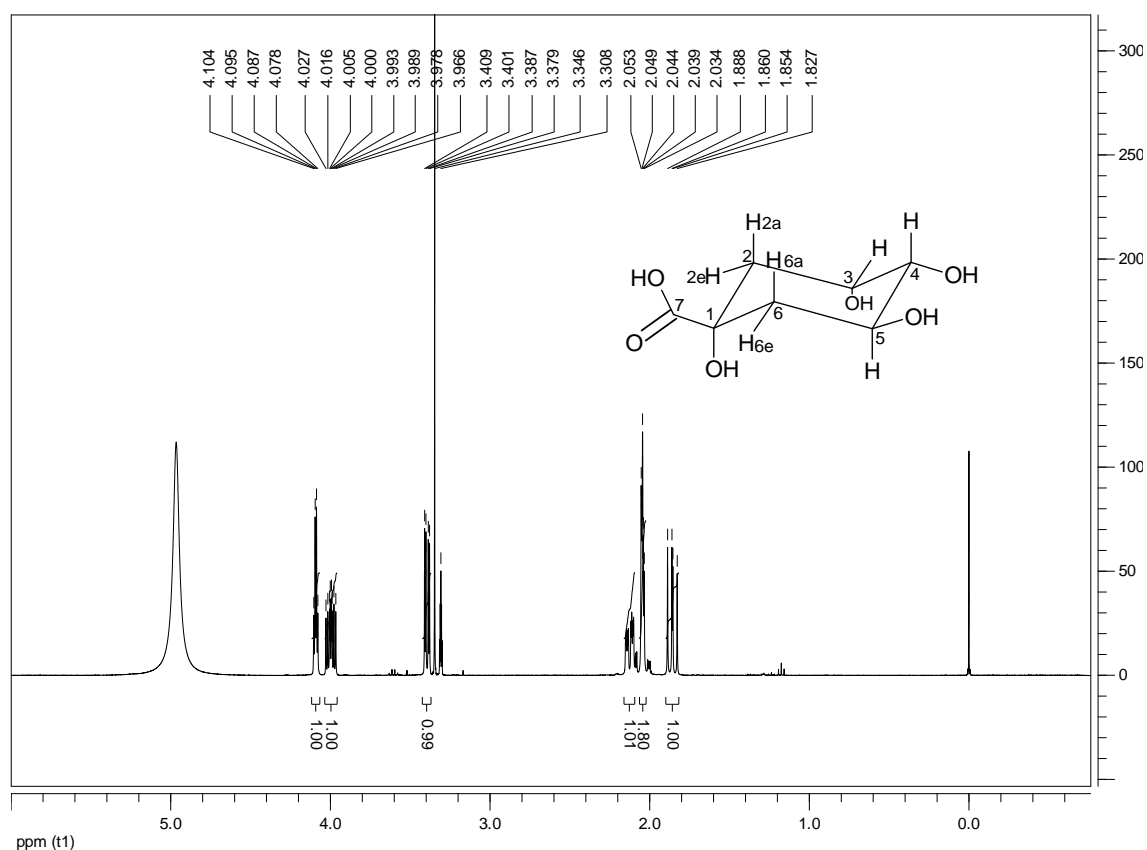


FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO QUÍNICO
 FONTE: O autor (2008)

Feita uma ampliação da região de δ entre 1,80 ppm e 2,18 ppm, do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 35) para a caracterização dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos não carbinólicos.

Dois pares de hidrogênios geminais da molécula, H-2 (a, e) e H-6 (a, e), foram observados em 1,86 e 2,13 ppm para H-6 e em 2,04 ppm para H-2.

O duplo duplete em 1,86 ppm diz respeito ao hidrogênio seis axial (6a), que acopla com o hidrogênio geminal seis equatorial (6e) e com o hidrogênio cinco, também em posição axial, com constantes de acoplamento respectivamente de 13,25 Hz e 10,88 Hz.

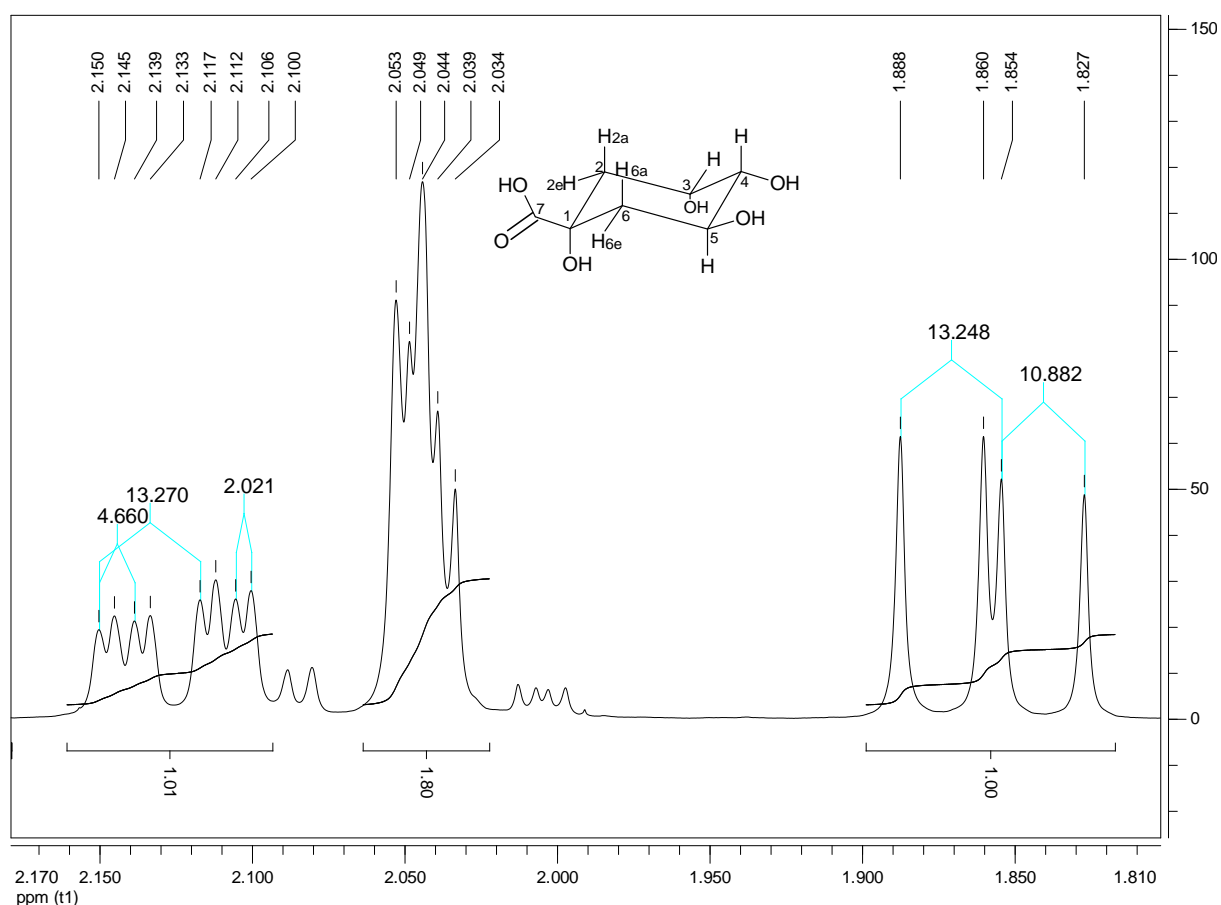


FIGURA 35 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 1,80 PPM E 2,18 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO QUÍNICO
 FONTE: O autor (2008)

O sinal do hidrogênio 6e, aparece em 2,13 ppm como um duplo duplo duplete, tendo o maior valor de J , 13,27 Hz, pertencente ao acoplamento geminal com o hidrogênio 6a, seguido da constante de acoplamento de 4,66 Hz, referente ao acoplamento com o hidrogênio do carbono cinco e da constante de acoplamento, de 2,02 Hz, de um acoplamento à longa distância, tipo-W, com o hidrogênio 2e.

O sinal em 2,04 ppm, mostra integração para os dois hidrogênios do carbono dois, cuja multiplicidade e constantes de acoplamento não puderam ser determinadas.

Em 3,43 ppm (APÊNDICE 3) aparece o sinal do hidrogênio do carbono quatro. A multiplicidade é típica de um duplo duplete. Há o acoplamento *trans*-diaxial com o hidrogênio do carbono cinco, cuja constante de acoplamento é de 9,15 Hz e o acoplamento axial-equatorial com o hidrogênio do carbono três, cujo J é de 3,18 Hz.

Uma ampliação da região de δ entre 3,97 ppm e 4,16 ppm do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 36) mostra dois sinais. Em 4,02 ppm aparece o sinal de hidrogênio do carbono cinco; a multiplicidade, um duplo duplo duplete, é devida ao acoplamento *trans*-diaxial com o hidrogênio 6a, que resulta em um J de 10,83 Hz, um acoplamento *trans*-diaxial com o hidrogênio do carbono quatro, cuja constante de acoplamento é de 9,20 Hz e finalmente acoplamento axial-equatorial com o hidrogênio 6e, de J 4,66 Hz. O sinal em 4,12 ppm, um quarteto, é referente ao hidrogênio do carbono três, que acopla tanto com o hidrogênio do carbono quatro quanto com os hidrogênios do carbono dois com J de 3,42Hz.

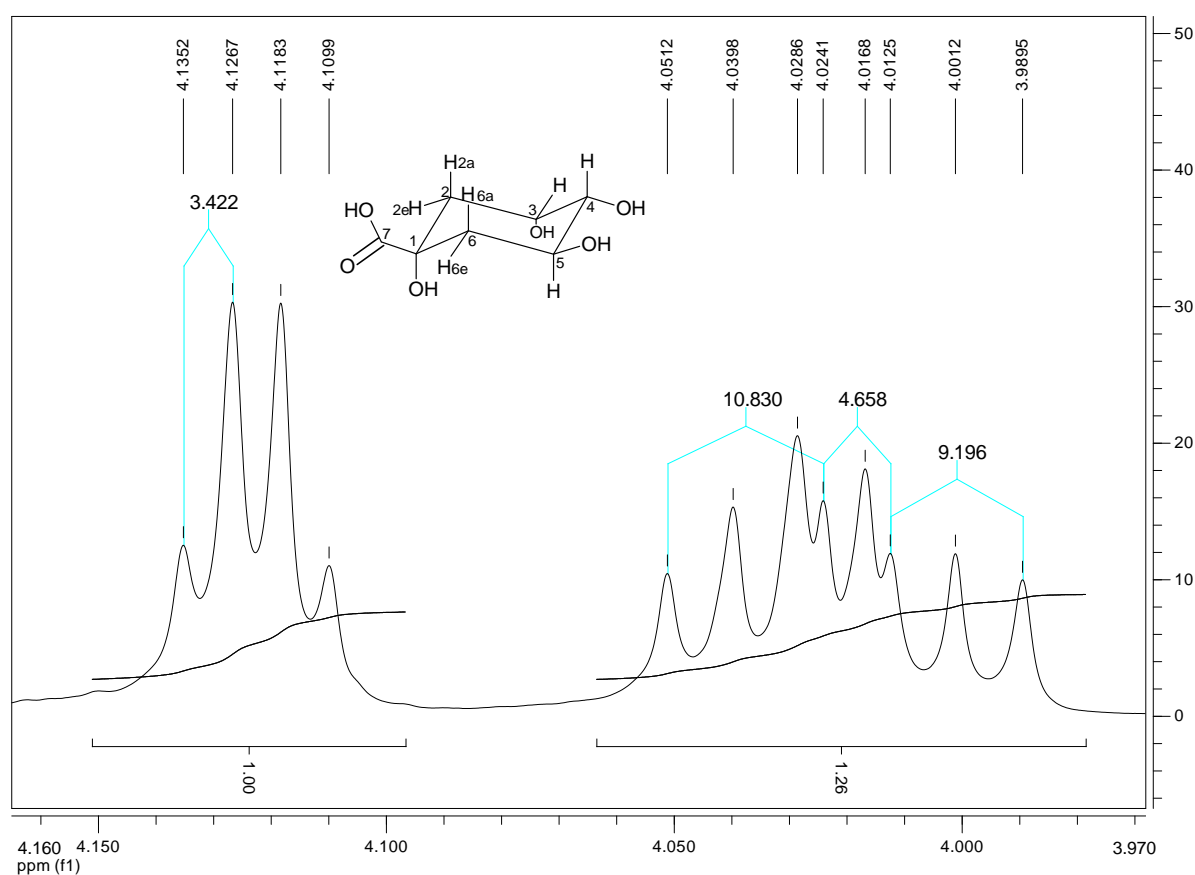


FIGURA 36 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 3,97 PPM E 4,16 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO QUÍNICO

FONTE: O autor (2008)

A fórmula molecular do ácido quínico é $C_7H_{12}O_6$ e seu espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 37) apresentou seis sinais. Um dos carbonos não está evidenciado no espectro, indicando uma possível sobreposição de sinais. O sinal em 177,84 ppm refere-se ao carbono sete, uma carboxila. Em 76,86 ppm está o sinal do carbono quatro, em 71,81 ppm o do carbono três e em 67,89 ppm o do carbono cinco. Em 42,20 ppm e em 38,27 ppm estão respectivamente os sinais dos carbonos seis e dois.

O espectro de DEPT-135 (APÊNDICE 4) mostra cinco sinais, sendo dois CH_2 , carbonos seis e dois, e três CH , carbonos quatro, cinco e três.

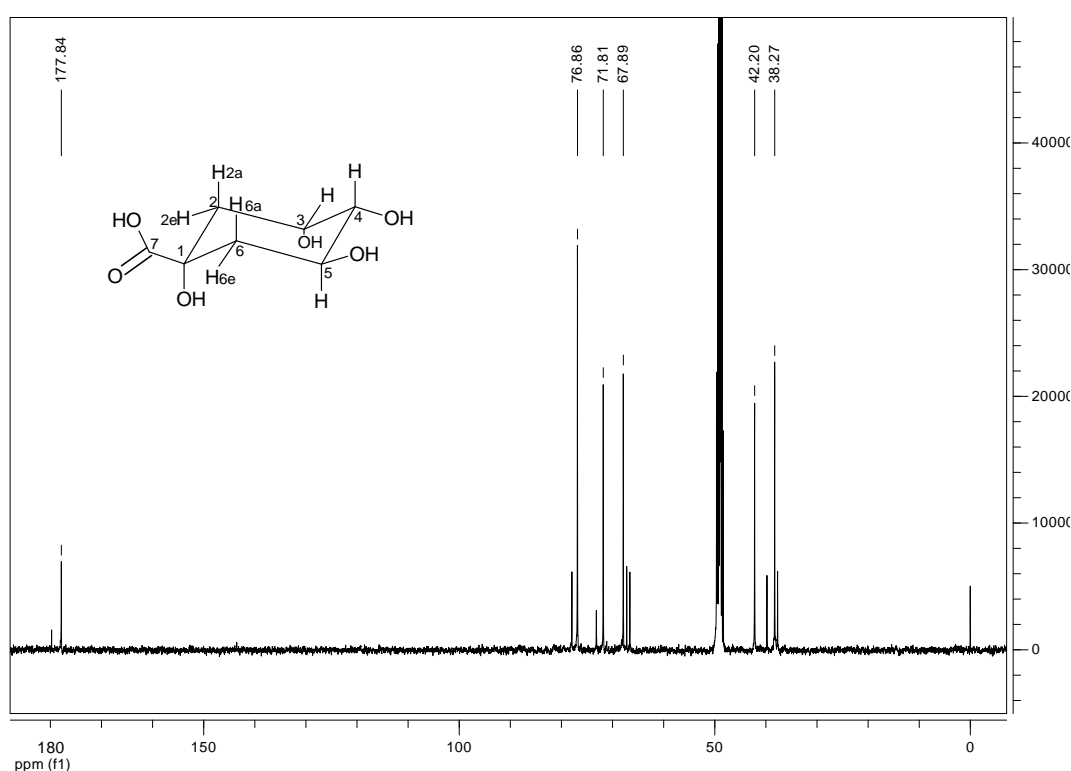


FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ÁCIDO QUÍNICO
FONTE: O autor (2008)

Dados da literatura apresentados por Scholz-Böttcher *et al.* (1991) para o ácido quínico (TABELA 9), utilizando equipamento em 400 MHz para 1H e 100 MHz para ^{13}C , mas como solvente D_2O , mostram resultados similares aos relatados neste trabalho, sendo consideradas satisfatórias as pequenas diferenças entre os

deslocamentos e as constantes de acoplamento, considerando que os solventes não são os mesmos.

TABELA 9 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA O ÁCIDO QUÍNICO

POSIÇÃO	$^{13}\text{C}(\delta)^{a,b}$	$^{13}\text{C}(\delta)^c$	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^c
1	-	76,3		
2a*	38,27	37,4	-	2,11 (dd, 14,8; 3,3)
2e**			-	2,05 (ddd, 14,8; 3,9; 2,6)
3	71,81	70,7	4,12 (q, 3,42)	4,16 (q, 3,9; 3,4; 3,3)
4	76,86	75,5	3,43 (dd, 9,15; 3,18)	3,54 (dd, 9,4; 3,4)
5	67,89	67,0	4,02 (ddd, 10,83; 9,20; 4,66)	4,03 (ddd, 11,0; 9,4; 4,6)
6a	42,20	40,9	1,86 (dd, 13,25; 10,88)	1,91 (dd, 13,5; 11,0)
6e			2,13 (ddd, 13,27; 4,66; ;2,02)	2,16 (ddd, 13,5; 4,6; 2,6)
7	177,84	178,4		

^a Experimento realizado pelo autor a 400 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em metanol- d_4 , utilizando o TMS como padrão interno; ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C ; ^c Dados da literatura de acordo com SCHOLZ-BÖTTCHER *et al.* (1991) (^1H , 400,13 MHz; ^{13}C , 100,61 MHz; D_2O); (δ) Deslocamento químico em ppm. * axial. ** equatorial.
FONTE: O autor (2008)

5.2.2.1.1.3 Espectro de massas

O composto de R_f 0,35, em CCD, acusou m/z 191,0 Da de massa molecular no espectrômetro de massas, no modo negativo, $[\text{M}-\text{H}]^-$ e confirma os valores teóricos atribuídos à fórmula molecular do padrão do ácido quínico ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$) (FIGURA 38).

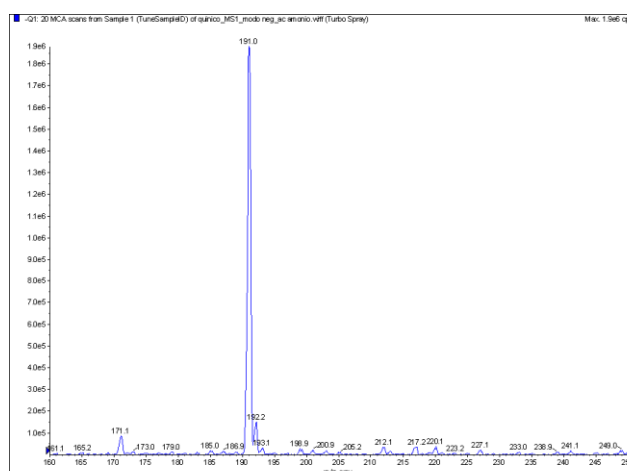


FIGURA 38 - ESPECTRO DE MASSAS (EM1), EM MODO NEGATIVO, DO PADRÃO DO ÁCIDO QUÍNICO
FONTE: O autor (2008)

O perfil de fragmentação para o composto, nos íons produto, modo EM2 (FIGURA 39), revelou maiores proporções dos fragmentos, m/z 85,1 Da, m/z 87,0 Da, m/z 93,1 Da e m/z 127,1 Da.

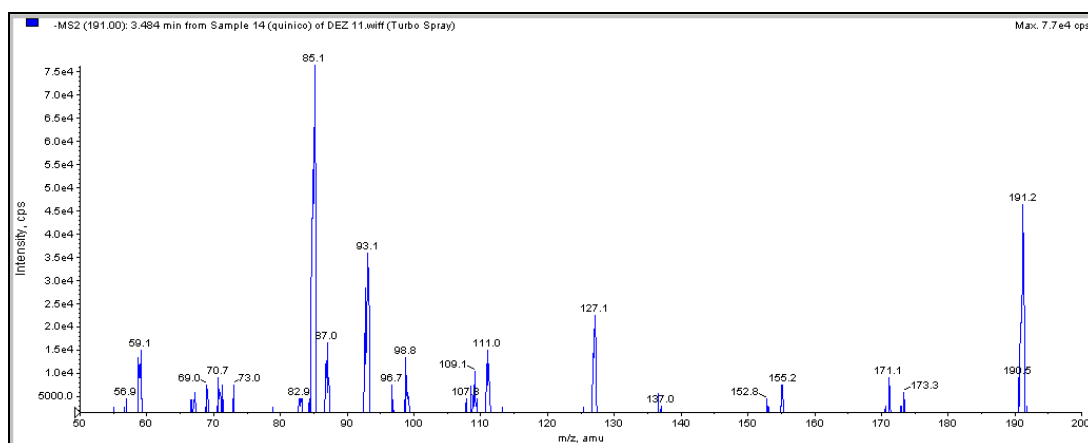


FIGURA 39 - ESPECTRO DE MASSAS (EM2), EM MODO NEGATIVO, DO PADRÃO DO ÁCIDO QUÍNICO
FONTE: O autor (2008)

Para justificar os fragmentos resultantes do íon precursor, a (FIGURA 40) propõe que os íons produto m/z 87,0 Da e m/z 85,1 Da, representem o equilíbrio dinâmico das estruturas ceto-enólicas, originadas pela ruptura do ciclohexano-carboxílico por cisão através de energia de colisão de -32 V. Energia mais alta do que a necessária para formar os íons quantificadores dos isômeros do ácido dicafeoilquínico, que não apresentaram perfil de fragmentação envolvendo quebra do ciclo da unidade quínica. Como o pico mais intenso refere-se ao íon m/z 85,1 acredita-se que a grande concentração dos fragmentos em equilíbrio permaneça em suas formas estáveis, ao passo que os íons m/z 87,0 degradam-se ainda mais pela perda de moléculas de água, ou gás carbônico e acabem por resultar em pico de menor intensidade entre os selecionados. Outro fragmento escolhido como quantificador e de concentração significativa foi o íon m/z 93,1 Da, de elevada estabilidade quando comparado ao íon m/z 127,1 Da, como demonstra a proposta.

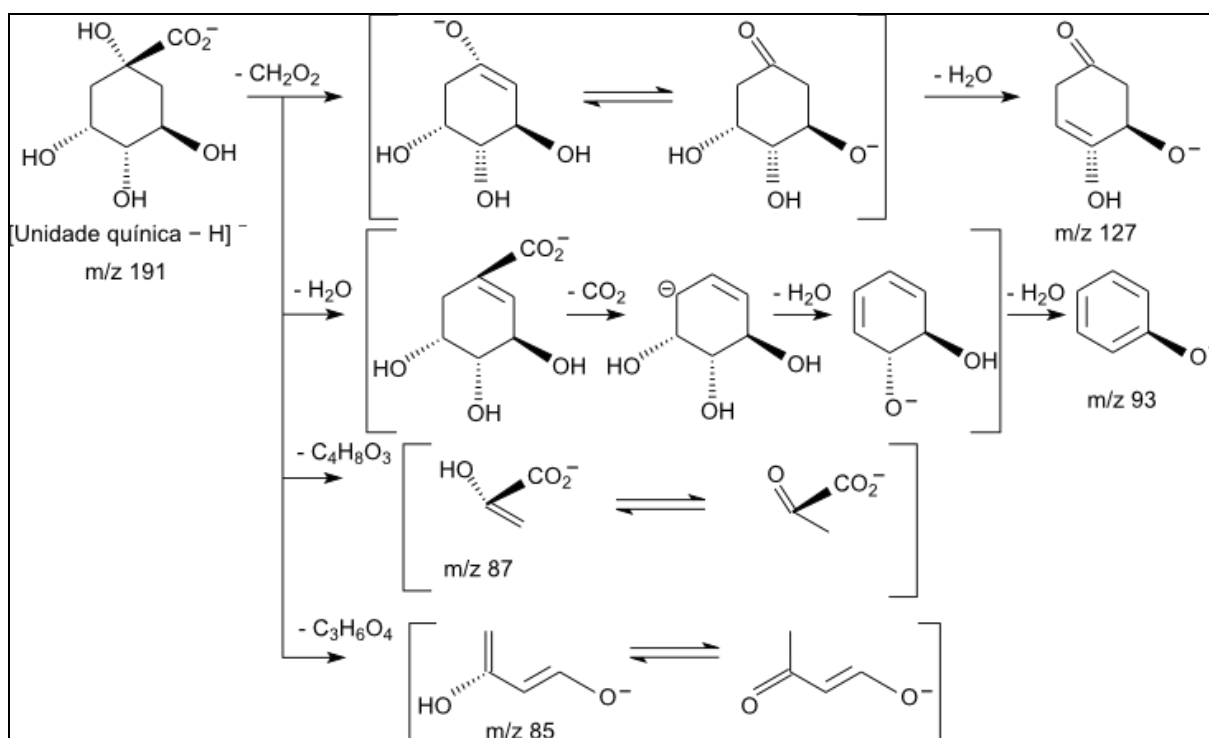


FIGURA 40 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA O ÁCIDO QUÍNICO
 FONTE: Modificado pelo autor (2008)

As variações em décimos de unidades obtidas para um mesmo composto, são comuns para obtenção dos espectros em dias diferentes.

5.2.3 Identificação da quinida

5.2.3.1.1 Espectro de RMN

Os sinais referentes aos sete hidrogênios da substância estão mostrados com suas respectivas integrações (FIGURA 41). Em 3,31 ppm, está o quinteto característico do solvente, metanol- d_4 . Dos sete hidrogênios, três deles (3, 4 e 5) estão mais deslocados e os outros quatro (2a, 2e, 6a e 6e) estão mais protegidos.

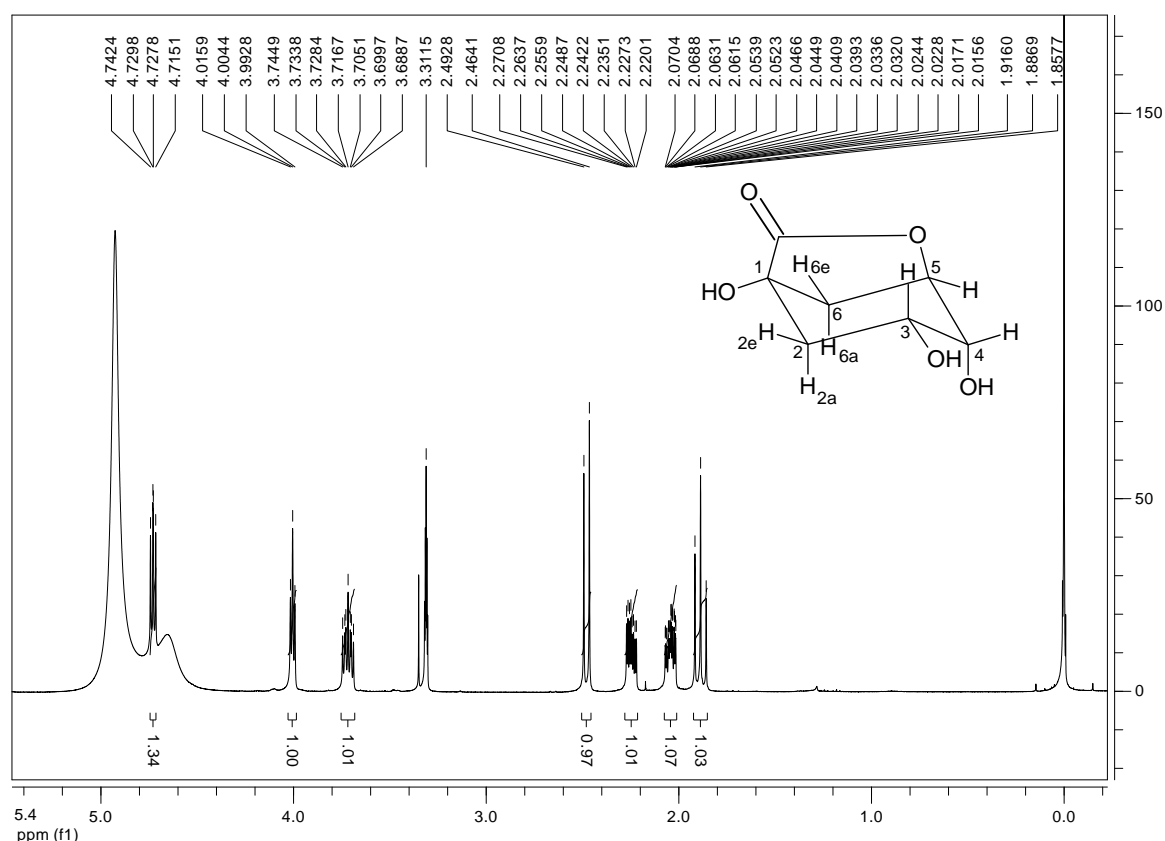


FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA
 FONTE: O autor (2008)

Feita uma ampliação da região de δ entre 1,85 ppm e 2,08 ppm do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 42) para caracterização dos sinais referentes aos hidrogênios ligados ao carbono 2. O tripleto em 1,88 ppm é referente ao hidrogênio dois axial (2a), que acopla com o hidrogênio geminal dois equatorial (2e) e com o hidrogênio três, também em posição axial, com constantes de acoplamento bastante semelhantes, cujo valor é de 11,63 Hz, o que faz com que a multiplicidade apareça como um tripleto. Já o sinal do hidrogênio 2e surge em 2,04 ppm. Sua multiplicidade é de um duplo duplo duplo duplete. Há o acoplamento geminal com o hidrogênio 2a, cujo J é de 11,77 Hz, o acoplamento com o hidrogênio três, cuja constante de acoplamento é de 6,62 Hz e dois acoplamentos à longa distância, quatro ligações, com os hidrogênios do carbono seis: uma tipo-W com 6e e outra com 6a, cujos J são 2,89 Hz e 0,63 Hz, respectivamente.

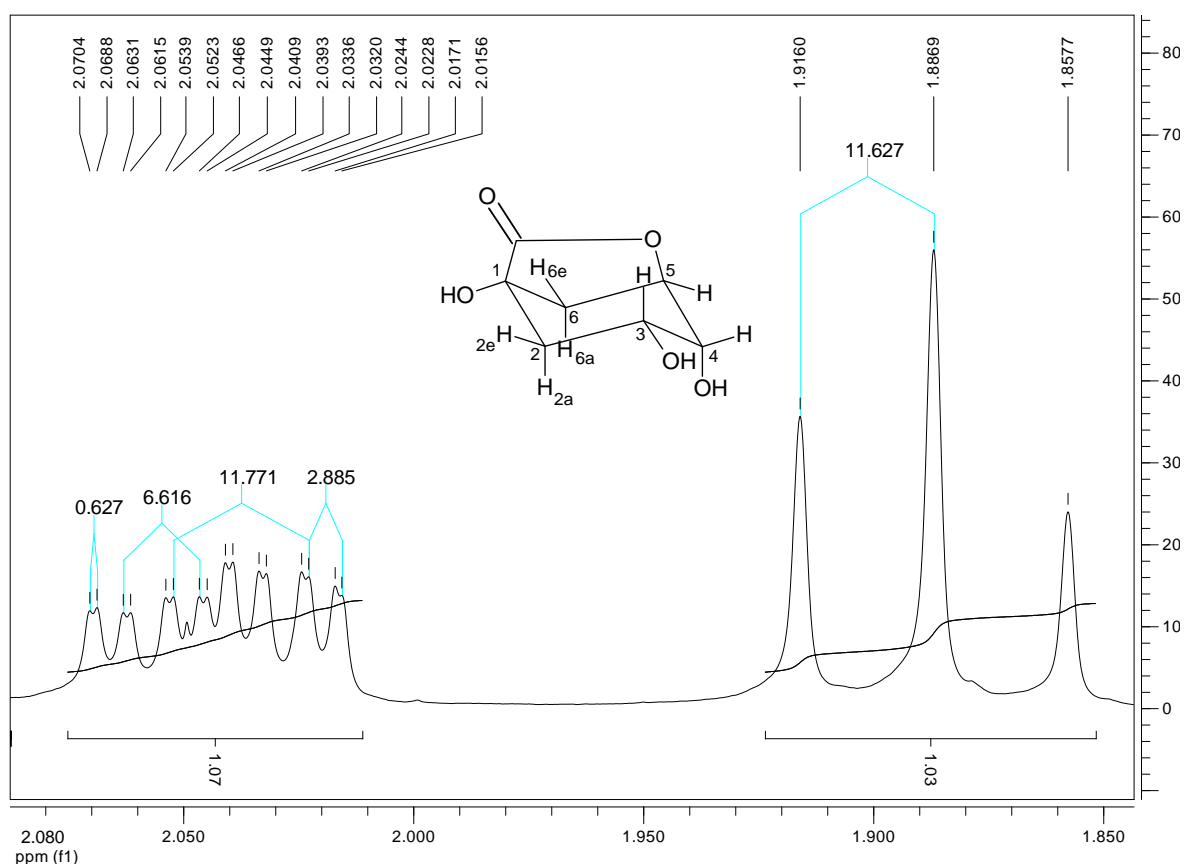


FIGURA 42 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 1,85 PPM E 2,08 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA
 FONTE: O autor (2008)

Uma ampliação da região de δ entre 2,20 ppm e 2,52 ppm do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 43) mostra os dois sinais dos dois hidrogênios do carbono seis. O sinal do hidrogênio 6a aparece em 2,48 ppm como um duplete pelo acoplamento com o hidrogênio 6e, geminal, com J de 11,47 Hz. Já o hidrogênio 6e surge como um duplo duplo duplete em 2,25 ppm, devido ao acoplamento geminal com o hidrogênio 6a, com J de 11,45 Hz, acoplamento axial-equatorial com o hidrogênio do carbono cinco com J de 5,98 Hz e um outro acoplamento à longa distância com J de 2,89 Hz com o hidrogênio 2e.

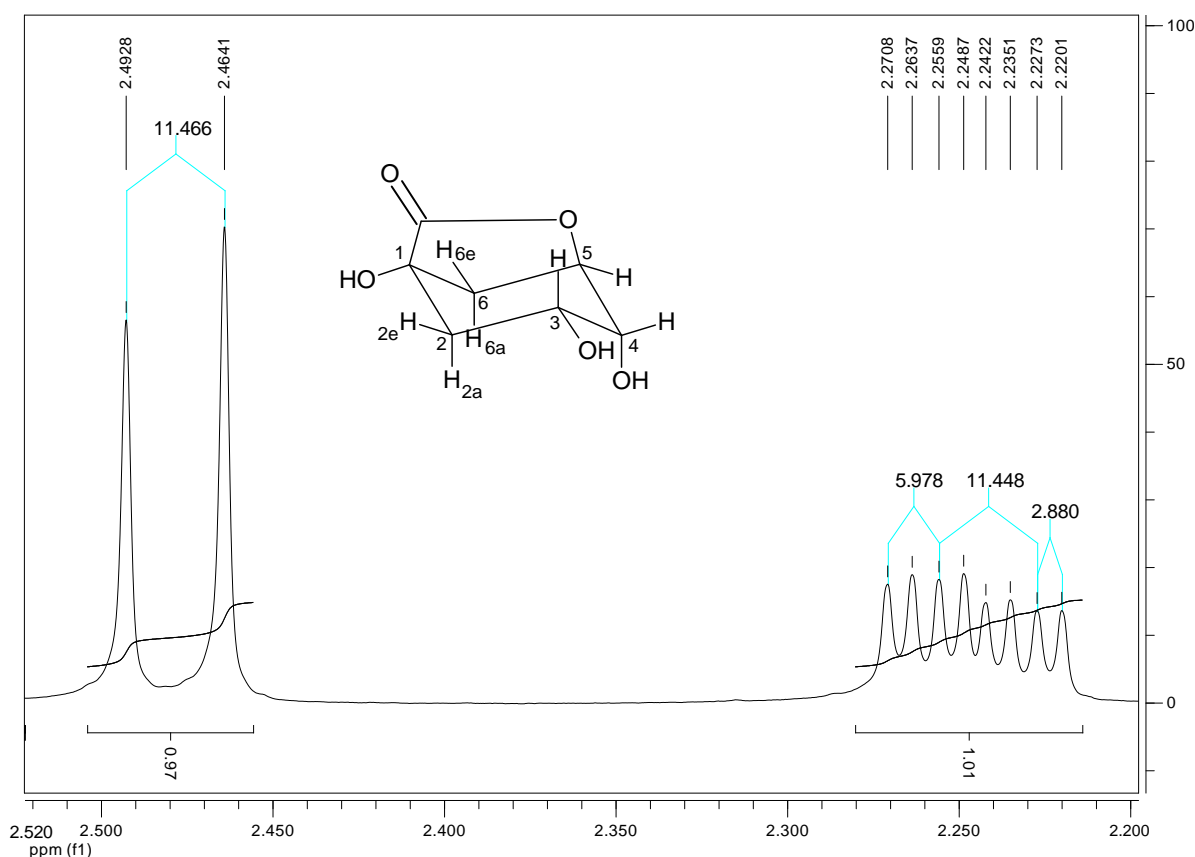


FIGURA 43 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 2,20 PPM E 2,52 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA
FONTE: O autor (2008)

Uma ampliação da região de δ entre 3,67 ppm e 4,05 ppm do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 44) mostra dois sinais. Em 3,72 ppm um sinal referente ao hidrogênio do carbono três. A multiplicidade, um duplo duplo duplete, é devida ao acoplamento axial-axial com o hidrogênio 2a, que resulta em um J de 11,26 Hz, acoplamento axial-equatorial com o hidrogênio 2e, cuja constante de acoplamento é de 6,60 Hz e finalmente acoplamento axial-equatorial com o hidrogênio do carbono quatro, de J 4,41 Hz. O sinal em 4,01 ppm é referente ao hidrogênio do carbono quatro, que acopla tanto com o hidrogênio do carbono cinco quanto com o hidrogênio do carbono três com J de 4,64 Hz, o que resulta na multiplicidade observada como triplete.

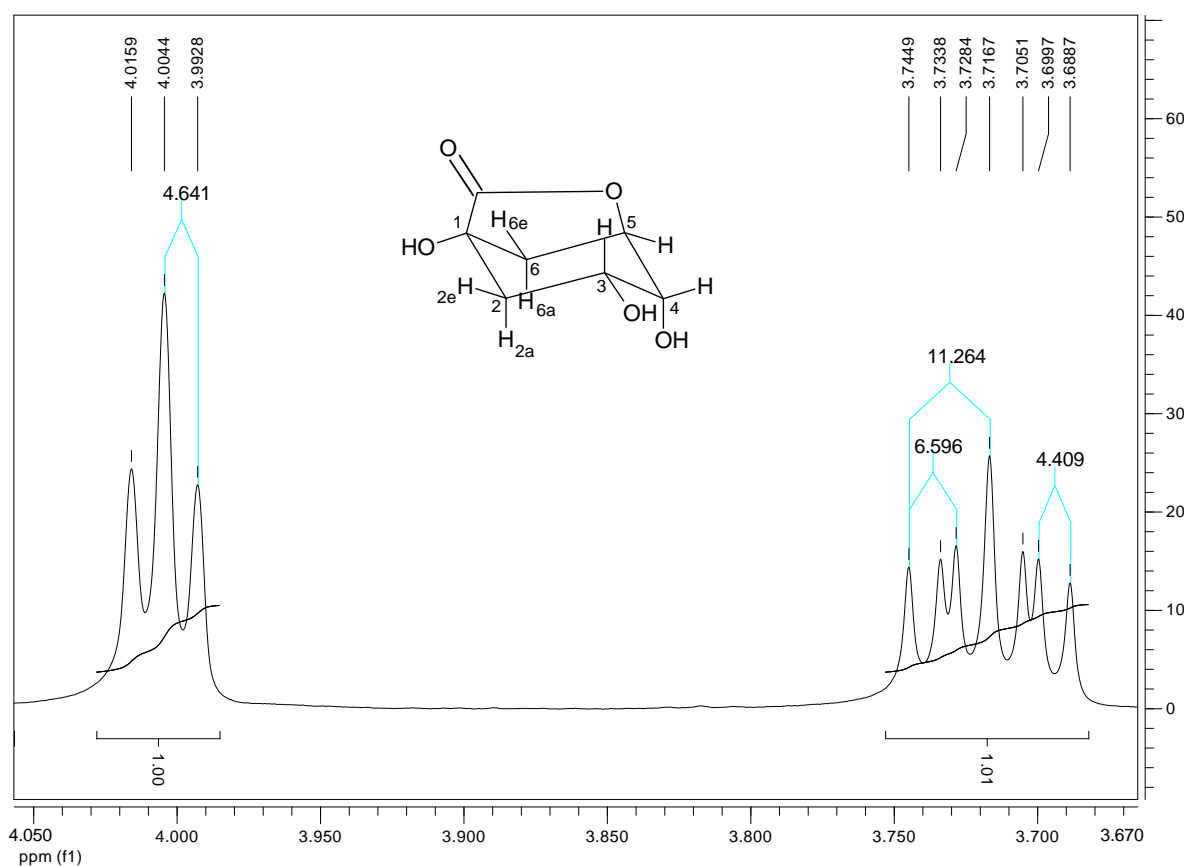


FIGURA 44 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 3,67 PPM E 4,05 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA
FONTE: O autor (2008)

Uma ampliação da região de δ entre 4,68 ppm e 4,78 ppm do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 45) mostra, em 4,72 ppm, o sinal do hidrogênio ligado ao carbono cinco. A multiplicidade é de um duplo duplete devido ao acoplamento com o hidrogênio 6e, com J de 5,83 Hz e com o hidrogênio do carbono quatro com constante de acoplamento de 5,08 Hz.

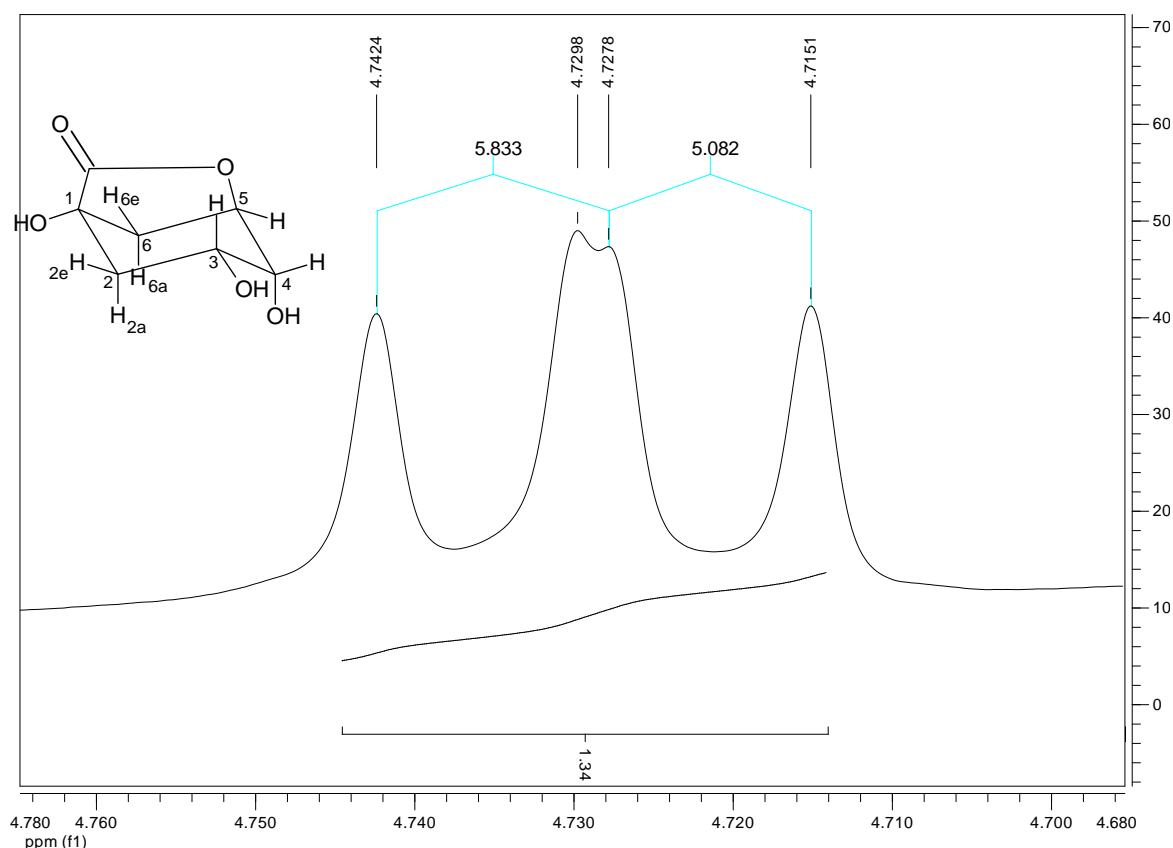


FIGURA 45 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 4,68 PPM E 4,78 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA QUINIDA

FONTE: O autor (2008)

A formação da lactona do ácido quínico envolve uma inversão da conformação. A quinida adota uma conformação onde o grupo carboxi e o grupo 5-hidroxi passam a ser axiais. O espectro de RMN de ^1H , característico da quinida, reflete esta troca. O H-5 do ácido quínico é a melhor referência para comprovar esta alteração, ele tem acoplamento *trans*-diaxial com o H-4 ($J_{5,4}$ 9,20) no ácido quínico, transformando-se num equatorial-axial na quinida ($J_{5,4}$ 5,08) da mesma forma com o H-6a. Já com o H-6e, o acoplamento muda de axial-equatorial ($J_{5,6e}$ 4,66) no ácido, para equatorial-equatorial ($J_{5,6e}$ 5,83) na lactona.

A fórmula molecular da quinida é $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5$. O espectro de RMN de ^{13}C da quinida (FIGURA 46) apresentou sete sinais, de acordo com a expectativa. O sinal em 179,63 ppm está associado ao carbono sete, uma carbonila. Em 73,15 ppm está o sinal do carbono um, um carbono quaternário, em 77,93 ppm o do carbono cinco, em 67,29 ppm o do carbono três e em 66,73 ppm o sinal do carbono quatro. Em

39,97 ppm e em 37,79 ppm estão respectivamente os sinais dos carbonos dois e seis.

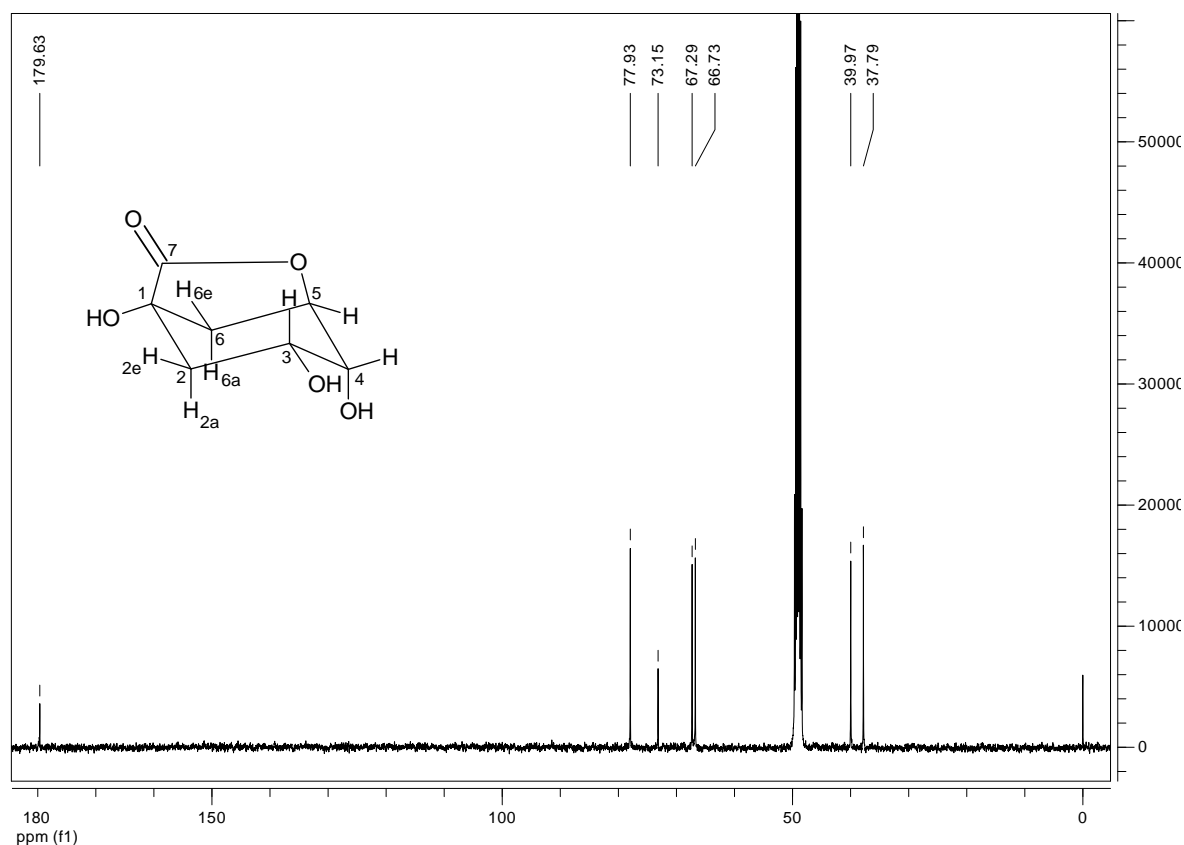


FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA QUINIDA
FONTE: O autor (2008)

Scholz-Böttcher *et al.* (1991) realizaram a identificação da γ -lactona do ácido quínico, para ^1H e ^{13}C , com experimento desenvolvido em equipamento operando em 400 MHz e 100 MHz, respectivamente (TABELA 10). Os autores registraram resultados muito próximos com os obtidos para identificação da quinida produzida em bancada neste experimento, sendo divergentes apenas os sinais obtidos para o hidrogênio cinco e também o solvente. Enquanto foi identificado um duplo duplete para o H-5, utilizando metanol- d_4 , os autores registraram um tripleto com óxido de deutério. Essa diferença na identificação da multiplicidade não pode ser atribuída ao solvente, mas possivelmente a resolução da região em que foi registrado o sinal, que não possibilitou melhor definição.

TABELA 10 - DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA A QUINIDA

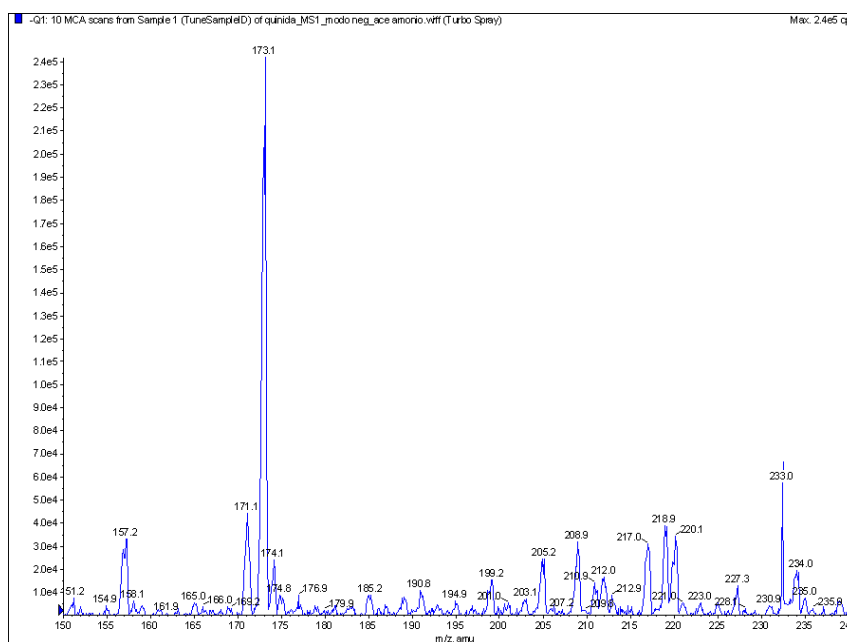
POSIÇÃO	$^{13}\text{C}(\delta)^{a,b}$	$^{13}\text{C}(\delta)^c$	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H} \delta$ (mult., J em Hz) ^c
1	73,15	73,1		
2a [*]	39,73	38,3	1,88 (1H, t, 11,63)	1,96 (1H, t, 11,7)
2e ^{**}			2,04 (1H, dddd, 11,7; 6,62; 2,89; 0,63)	2,16 (1H, dddd, 11,9; 6,7; 2,9; 0,8)
3	67,29	66,4	3,72 (1H, ddd, 11,26; 6,60; 4,41)	3,90 (1H, ddd, 11,7; 6,7; 4,5)
4	66,73	65,5	4,01 (1H, t, 4,64)	4,18 (1H, t, 4,5)
5	77,93	78,0	4,72 (1H, dd, 5,83 ;5,08)	4,93 (1H, t, 5,9)
6a	37,79	36,9	2,48 (1H, d, 11,47)	2,50 (1H, d; 11,8)
6e			2,25 (1H, ddd, 11,45; 5,98; 2,89)	2,43 (1H, ddd; 11,8; 5,9; 2,9)
7	179,63	180,4		

^a Experimento realizado pelo autor a 400 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em metanol- d_4 , utilizando o TMS como padrão interno; ^b Multiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C ; ^c Dados da literatura de acordo com SCHOLZ-BÖTTCHER *et al.* (1991) (^1H , 400,13 MHz; ^{13}C , 100,61 MHz; D_2O); (δ) Deslocamento químico em ppm. ^{*} axial. ^{**} equatorial.

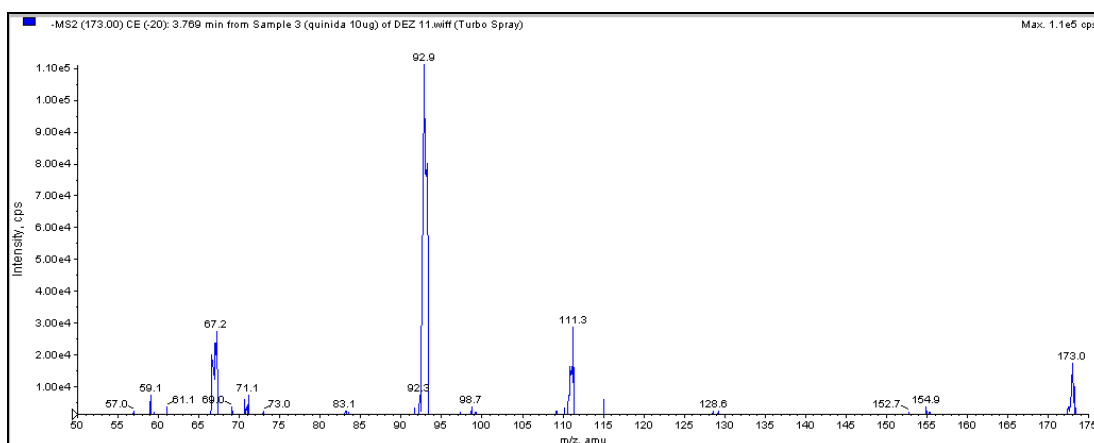
FONTE: O autor (2008)

5.2.3.1.1.2 Espectro de massas

A verificação da massa molecular no espectrômetro de massas de 173,1 Da no modo negativo, para o composto de R_f 0,42 confirma os valores teóricos atribuídos à fórmula molecular da quinida (FIGURA 47). Como o ácido quínico e a quinida mostraram identidades diferentes, descarta-se a possibilidade de serem confundidos.



O perfil de fragmentação para a quinida, obtido no modo EM2 (FIGURA 48), revela os íons produto m/z 67,2 Da, m/z 92,9 Da e m/z 111,3 Da.



Como proposta de fragmentação (FIGURA 49), o íon m/z 111,3 é formado pela perda de uma molécula de gás carbônico e uma de água do íon precursor. A perda de mais uma molécula de água a partir desta estrutura, resulta no íon

m/z 92,9, ânion fenóxido, de maior pico e, conseqüentemente, o de maior concentração entre os fragmentos resultantes.

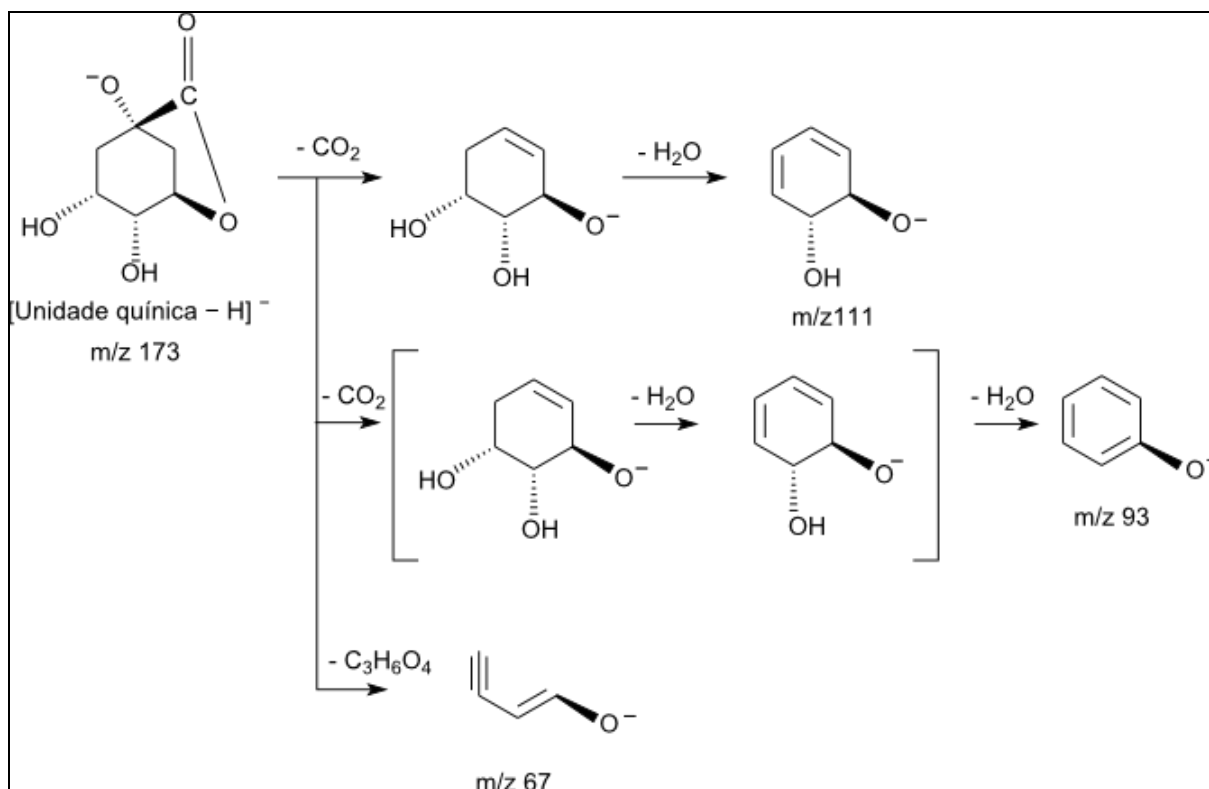


FIGURA 49 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO PARA A QUINIDA
FONTE: Modificado pelo autor (2008)

5.2.4 Quinida nas folhas verdes de erva mate

Não há registro, até o momento, da presença da γ -lactona bicíclica do ácido quínico, ou de qualquer outra derivada dos cafeoil ou dicafeoil quínicos, nas folhas verdes da erva mate. Assim, para comprovar sua existência, novas amostras foram colhidas de três matrizes diferentes, todas de uma mesma região. As folhas foram separadas dos talos, cortadas em pedaços pequenos e trituradas com pistilo. Com este procedimento, procurou-se descartar a hipótese de que o tratamento com o nitrogênio líquido tenha provocado qualquer influência sobre as amostras.

As mesmas condições experimentais, definidas anteriormente (item 4.6.1) como as melhores para a extração dos constituintes das amostras, foram empregadas e alíquotas de 50 μL de cada extrato, em triplicata, foram acrescentados a metanol 75%, padrão HPLC e encaminhadas para análise em espectrômetro de massas. Adotando-se os parâmetros cromatográficos em método já definido e sem a pretensão de quantificá-los, foram selecionados os fragmentos de m/z 67,0 Da e m/z 92,9 Da, como íons base para referência na identificação da quinida.

A (FIGURA 50) registra a presença da γ -lactona do ácido quínico, num cromatograma obtido no modo MRM, para uma das amostras de folha verde da erva mate.

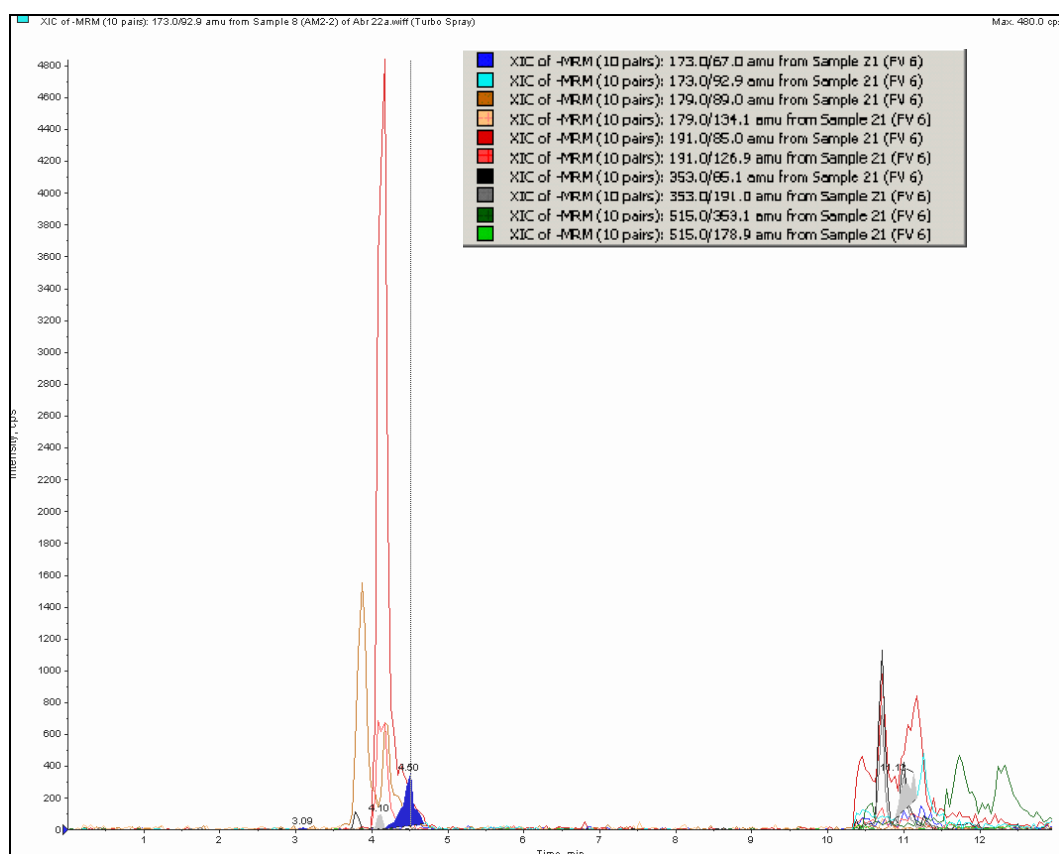


FIGURA 50 - CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE FOLHAS VERDES DA ERVA MATE
FONTE: O autor (2008)

Os cromatogramas também foram registrados no modo de varredura completa, *full scan*, contínuo durante toda a corrida cromatográfica. Este modo *full scan* da quinida, seleciona no primeiro quadrupolo a massa molecular específica deste analito, no segundo quadrupolo fragmenta o íon na razão m/z selecionada e no terceiro quadrupolo ocorre a transmissão dos íons secundários resultantes. Difere do modo MRM, onde o sistema controla fragmentos com uma faixa selecionada de m/z . O procedimento *full scan* permite a detecção de analitos específicos com maior sensibilidade.

A adoção deste procedimento deixou evidente a presença da γ -lactona do ácido quínico em todas as amostras avaliadas. A (FIGURA 51) registra a presença da quinida em uma das amostras de folha verde da erva mate, no modo *full scan*, no tempo de retenção de 4,49 min. É possível que os outros picos cromatográficos registrados nos tempos de retenção que correspondem aos demais padrões estejam associados às suas respectivas lactonas “vistas” pelos mesmos fragmentos de m/z 67,0 Da e m/z 92,9 Da, selecionados para a quinida do ácido quínico. Tanto os isômeros dos ácidos clorogênicos, quanto os isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos, têm em sua molécula uma unidade de ácido quínico e formam lactonas cíclicas.

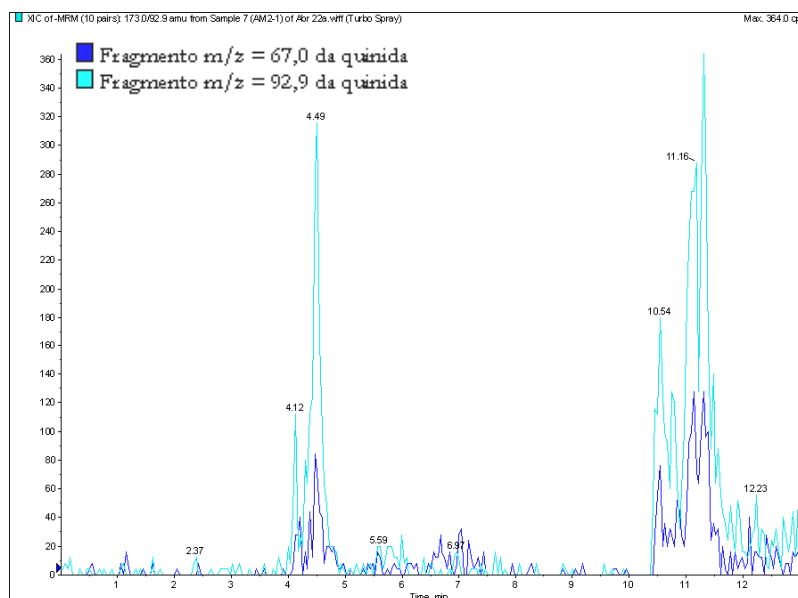


FIGURA 51 - CROMATOGRAMA OBTIDO NO MODO *FULL SCAN* DA QUINIDA, DE UMA AMOSTRA DE FOLHAS VERDES DA ERVA MATE, EVIDENCIADO PELOS FRAGMENTOS DE m/z 67,0 E m/z 92,9 DA QUINIDA

FONTE: O autor (2008)

Na (FIGURA 40) podem ser identificados: em 4,12 min. o ácido quínico, em 4,49 min. a quinida, em 10,54 min. o ácido clorogênico, em 11,16 min. o ácido dicafeoilquínico e nos demais tempos de retenção, isômeros e interferentes da matriz, não identificados.

O ácido quínico e quinida já foram encontrados em outras plantas. A iniciativa desta pesquisa para a investigação da quinida nas amostras de erva mate, surgiu dos inúmeros relatos em literatura de estudos realizados com café torrado (FARAH, 2005; 2006; TRUGO, 1984). Shearer *et al.* (2003) mencionam o fato de o café torrado transformar alguns clorogênicos em novos compostos únicos para o café, referência feita às quinidas.

No processo de industrialização da erva, suas folhas também passam por aquecimento. Assim, esperava-se encontrar quinida como integrante dos produtos comerciais nas etapas finais da linha de produção: as folhas tostadas.

Em estudo para investigar a cinética e as condições de pirólise do ácido clorogênico, realizado por Sharma *et al.* (2002), variando-se as condições de aquecimento, concluiu-se que: a pirólise ocorre completamente a 400°C, mas decomposições significativas são observadas a partir de 450°C. Ainda, os principais compostos voláteis resultantes são água, monóxido de carbono, dióxido de carbono, fenol, catecol e ácido benzóico; com o aumento da temperatura, a concentração de outros compostos oxigenados nos produtos gasosos diminui enquanto aumenta a formação de H₂O, CO e CO₂. Os autores ainda relatam a existência de fenol e catecol como alguns dos constituintes indesejáveis na fumaça do cigarro. Como as folhas do tabaco são constituídas de 2 a 3% de ácido clorogênico, além de outros compostos fenólicos, são atribuídos a estes compostos aroma e sabor característicos. Deste estudo resultou ainda proposta de um esquema postulado para a reação de pirólise do ácido clorogênico (FIGURA 52):

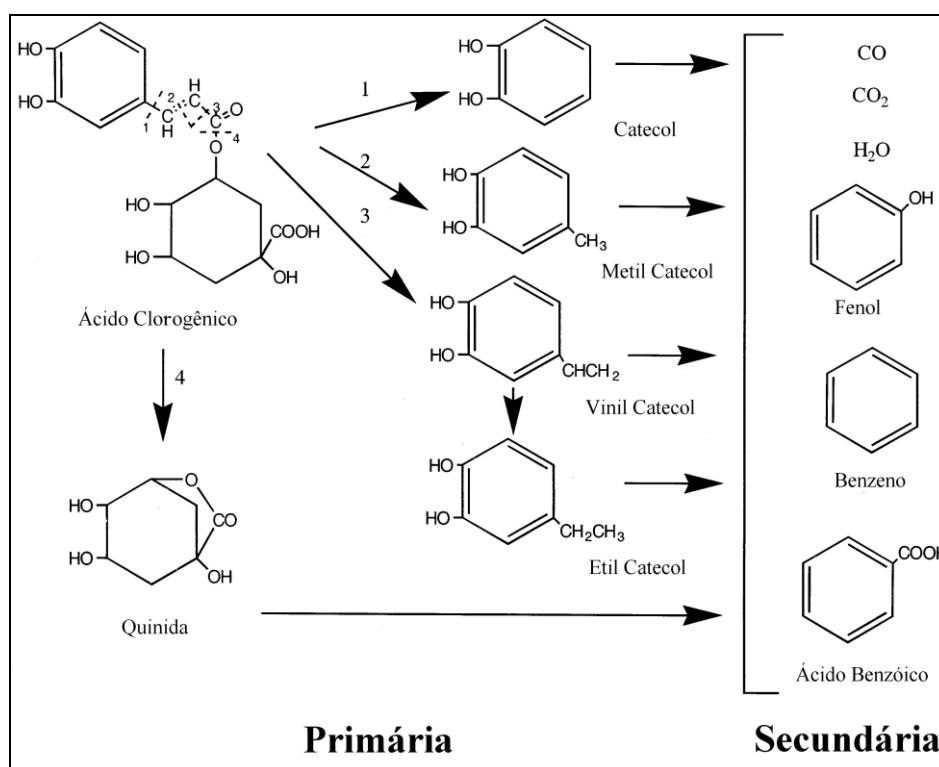


FIGURA 52 - ESQUEMA POSTULADO PARA A REAÇÃO DE PIRÓLISE DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

FONTE: Adaptado de SHARMA *et al.* (2002)

A partir destas observações, supõe-se que a existência da quinida nas folhas verdes resulta da decomposição natural dos isômeros do ácido clorogênico na γ -lactona bicíclica do ácido quínico. Estudos complementares podem ser realizados com amostras de uma única matriz em toda a linha de produção da erva mate e do chá mate, acompanhando detalhadamente a massa foliar e os voláteis produzidos, em sistemas similares aos realizados no estudo da pirólise do ácido clorogênico.

Os mecanismos pelos quais são responsáveis, ou os efeitos provocados em sistemas biológicos, ainda não são totalmente conhecidos. Em experimentos realizados por Shearer *et al.* (2003), com solução salina, extrato de café descafeinado e de uma quinida sintética, especificamente 3,4-diferuloil-1,5-quinida, seus resultados demonstraram que a quinida teve melhor resposta na eliminação da glucose, injetada durante o experimento para manter a euglicemia (normalidade do nível de glucose no sangue).

5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

Avaliar a intensidade com que os fatores independentes afetam as quantidades extraídas de compostos de diferentes teores (ácido quínico, ácido clorogênico e ácido cafeico) na planta é de extrema importância na otimização de ensaios, economizando tempo e insumos, além de garantir maior eficiência nos resultados.

5.3.1 Ácido quínico

A (FIGURA 53) ilustra os gráficos de efeitos principais para o ácido quínico. Cada gráfico é elaborado através das médias dos ensaios realizados, distribuindo-as, da seguinte maneira: os pontos à esquerda indicam as médias de todos os ensaios usando os menores níveis para cada variável investigada, os pontos à direita indicam a média de todos os ensaios usando os maiores níveis e a linha central indica a média de todas as respostas (áreas dos analitos) do experimento.

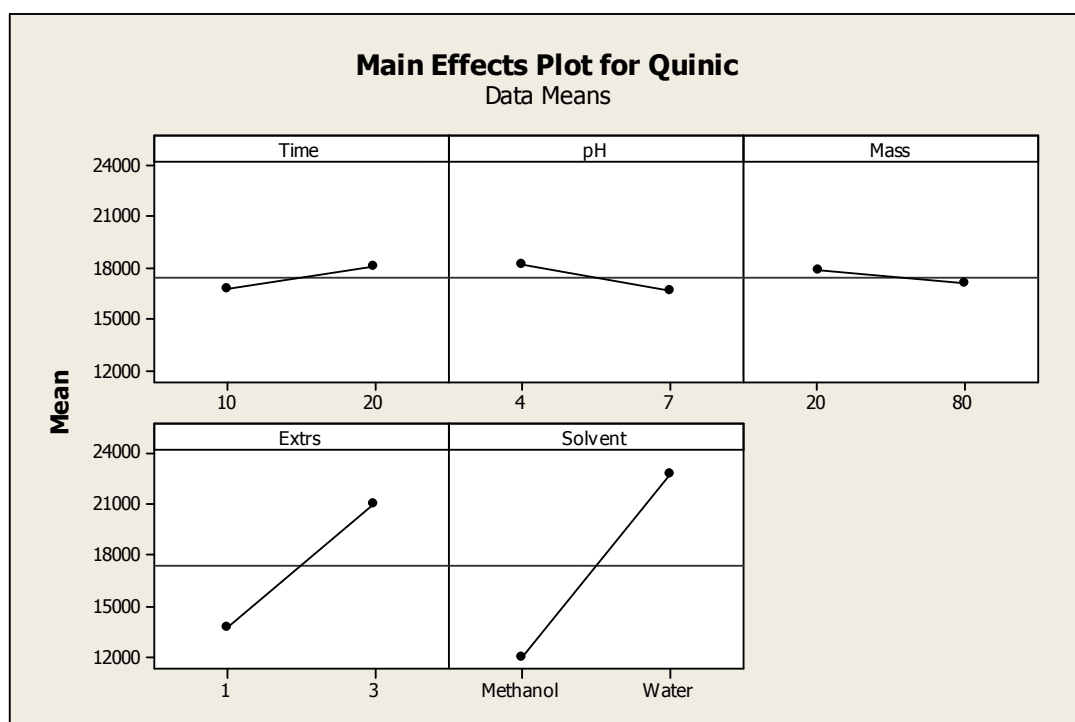


FIGURA 53 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS PRINCIPAIS PARA A EXTRAÇÃO DE ÁCIDO QUÍNICO DE AMOSTRA DE ERVA MATE
 FONTE: O autor (2008)

O número de extrações e natureza do solvente apresentaram maior amplitude na variação das médias das áreas, representando significativas diferenças (95% de significância), quando se aumenta o número de extrações de uma para três e quando se altera a natureza do solvente de metanol puro para água pura. As variações provocadas no tempo de ultrassom, pH e massa da amostra registram pequenas variações nas áreas medidas do analito, representando, como efeitos principais, baixa influência na extração do ácido quínico da amostra de erva mate.

Nos gráficos de interação, representados na (FIGURA 54), evidencia-se o impacto que a mudança das configurações de um fator exerce sobre outro fator, pois a interação pode ampliar ou diminuir os efeitos principais. Se não houvesse interações significativas entre os fatores, um gráfico de efeitos principais descreveria adequadamente as melhores respostas para cada variável em estudo. Como as interações se mostram significativas, elas podem afetar a interpretação dos efeitos principais.

Em cada gráfico, avaliado em separado, indicam-se na abscissa os níveis do segundo fator, enquanto as legendas (à direita) exibem os níveis do primeiro fator em comparação. Os pontos representam as áreas médias resultantes da combinação entre os fatores avaliados. Quanto maior a inclinação da linha, maior a influência do fator e, também, quanto maior a possibilidade de concorrência das linhas em um ponto, maior o efeito de interação entre as variáveis.

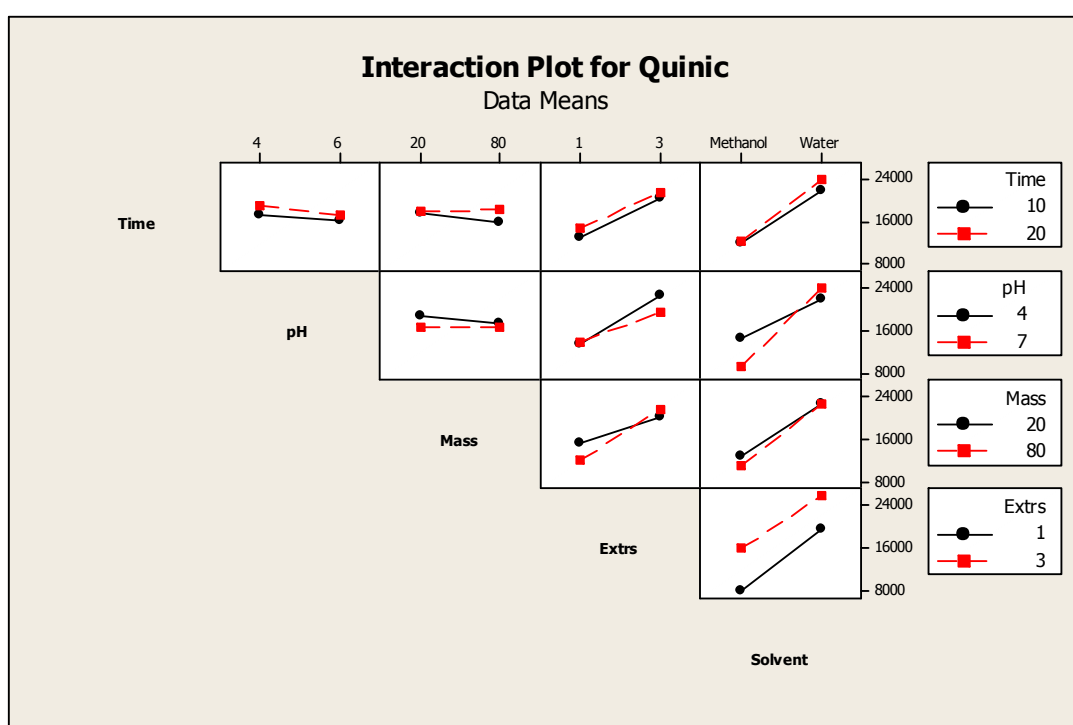


FIGURA 54 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO ENTRE DUAS VARIÁVEIS PARA A EXTRAÇÃO DE ÁCIDO QUÍNICO DE AMOSTRA DE MATE
FONTE: O autor (2008)

Quanto aos efeitos de interação para o ácido quínico, as interações entre as variáveis pH e natureza do solvente foram significativas, produzindo melhores resultados quando se aumenta o pH de 4 para 7 e se utiliza como solvente a água, seguida da interação entre massa da amostra e o número de extrações, resultando melhores efeitos quando a massa da amostra é de 80 mg com três extrações.

O (GRÁFICO 1) destaca a influência dos efeitos principais e dos efeitos de interação entre duas variáveis. O gráfico de probabilidade normal é uma maneira

simples de verificar se os efeitos são desprezíveis, distinguindo entre os resultados, os valores que realmente correspondem aos efeitos de outros valores devidos a ruídos (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2003).

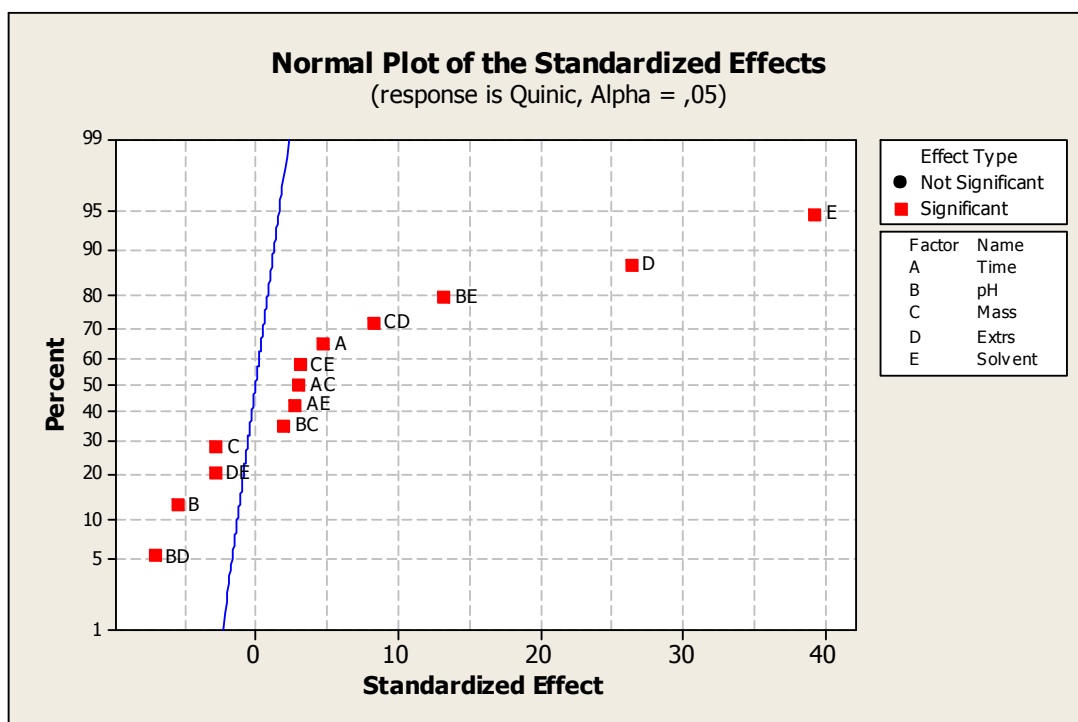


GRÁFICO 1 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO QUÍNICO DE AMOSTRA DE MATE

FONTE: O autor (2008)

Os efeitos desprezíveis são normalmente distribuídos e estarão numa reta e os efeitos consideráveis estarão fora da reta, sendo mais significativos quanto mais afastados estiverem da região central, seja para a direita, seja para a esquerda. A dispersão natural nas medidas dá-se em função do erro experimental. Ao se modelar um sistema, provavelmente, alguns parâmetros do modelo estarão descrevendo somente as variações ocasionadas por este erro (BORTOLOTTI *et al.*, 2007). Partindo-se do pressuposto que a reta centrada em zero (azul) representa os parâmetros que descrevem erros aleatórios, cujo valor verdadeiro seria zero, pois são exemplos de hipótese nula, os efeitos significativos não se incluem na reta, pois não fazem parte da mesma distribuição.

O gráfico é elaborado para testar a hipótese de que os efeitos, tanto os principais, quanto os de interação, não existem. Para isso, cada efeito é associado a um valor de probabilidade acumulada (eixo dos y), que representa a probabilidade de se observar um valor da variável, menor ou igual a um valor numérico específico para esta variável. Os pontos centrais se ajustam muito bem a uma reta que cruza a probabilidade acumulada de 50% praticamente sobre o ponto zero do eixo das abscissas (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2003). Devido às diferentes ordens de grandeza dos parâmetros, estes devem ser normalizados para serem comparados. Isto é feito dividindo-se os valores dos parâmetros pelos valores dos erros. Com isso, obtém-se a razão que indica o quanto um parâmetro supera seu erro (eixo dos x).

Esta análise reforça as melhores respostas para a variável E (natureza do solvente) e D (número de extrações) sobre as demais variáveis, podendo ainda ser considerada a influência da variável A (tempo de ultrassom) quando considerados os maiores tempos e B (pH do líquido extrator), quando considerados menores valores de pH. Apresenta baixo valor de efeito, exercendo conseqüentemente baixa influência, a variável C (massa de amostra). Exercem baixa influência as interações entre as variáveis DE (número de extrações e natureza do solvente) e as interações entre as variáveis BD, quando considerados menores valores de pH numa única extração.

Natureza do solvente (E) e número de extrações (D), são as variáveis mais importantes na extração do ácido quínico da amostra de erva mate comercial, quando considerados os seus efeitos principais. As variáveis pH do líquido extrator, massa da amostra e tempo de ultrassom exercem influência menos intensas. A velocidade de centrifugação, não representada graficamente, não se mostra significativa quando avaliada, podendo ser fixada em apenas um nível nos planejamentos que envolvam extração do ácido quínico nas amostras de erva mate comercial.

À primeira análise a combinação de fatores que melhor extraem o ácido quínico da amostra associa menor tempo de extração, maior pH, menor massa de amostra, maior número de extrações e solvente de maior natureza. Entretanto, a

maior área do sinal lido no espectrômetro de massas está relacionado ao ensaio 32, que combina, extração usando 80mg de amostra, em H₂O, pH=7, mantido por 20 minutos em banho de ultrassom e centrifugado a 10000 rpm, uma vez que considera as interações favoráveis entre pH e natureza do solvente, produzindo melhores resultados quando o pH passa de 4 para 7, utilizando a água como extrator, bem como da interação entre a massa da amostra e o número de extrações, surtindo melhores resultados quando a massa da amostra é de 80 mg com três extrações.

5.3.2 Ácido cafeico

A (FIGURA 55) define as melhores condições de extração do ácido cafeico, quando avaliado o comportamento dos efeitos principais, individualmente.

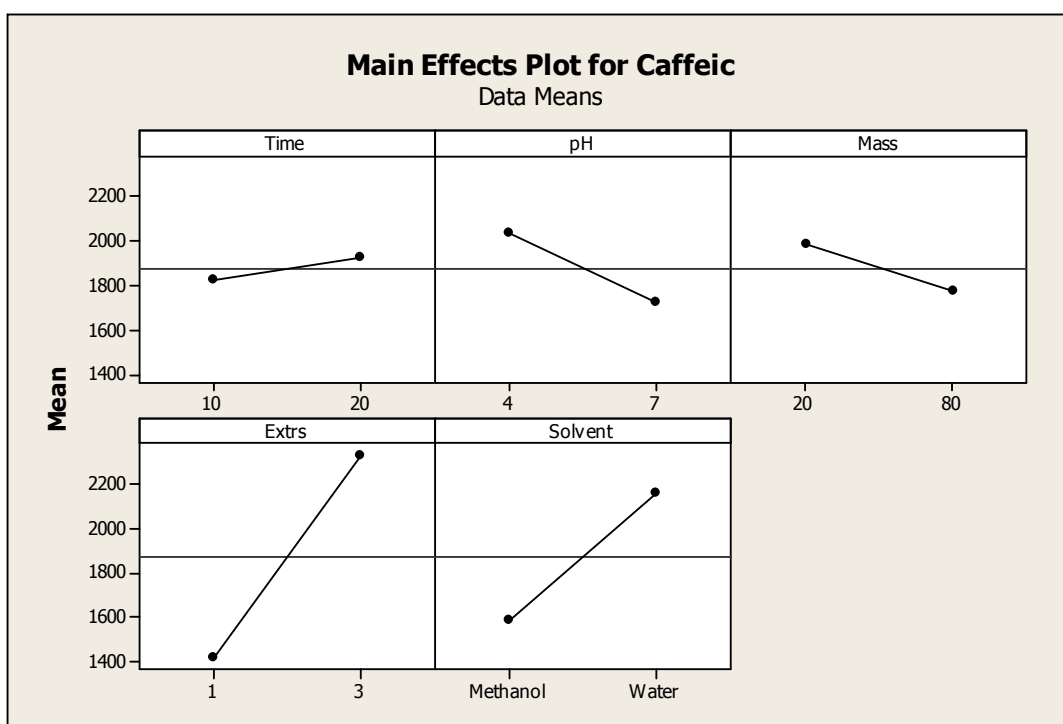


FIGURA 55 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS PRINCIPAIS PARA O ÁCIDO CAFEICO
FONTE: O autor (2008)

Os efeitos, número de extrações e natureza do solvente também apresentaram maior amplitude na variação das médias das áreas a 95% de confiança, melhorando os resultados quando se aumenta o número de extrações de uma para três e quando se altera a natureza do solvente de metanol puro para água pura. Já, os melhores resultados para pH e massa do solvente se obtêm quando são efetuadas extrações com menores valores, tanto de pH do solvente quanto de massa de amostra.

Quanto aos efeitos de interação, significativos entre duas variáveis são representados pela (FIGURA 56).

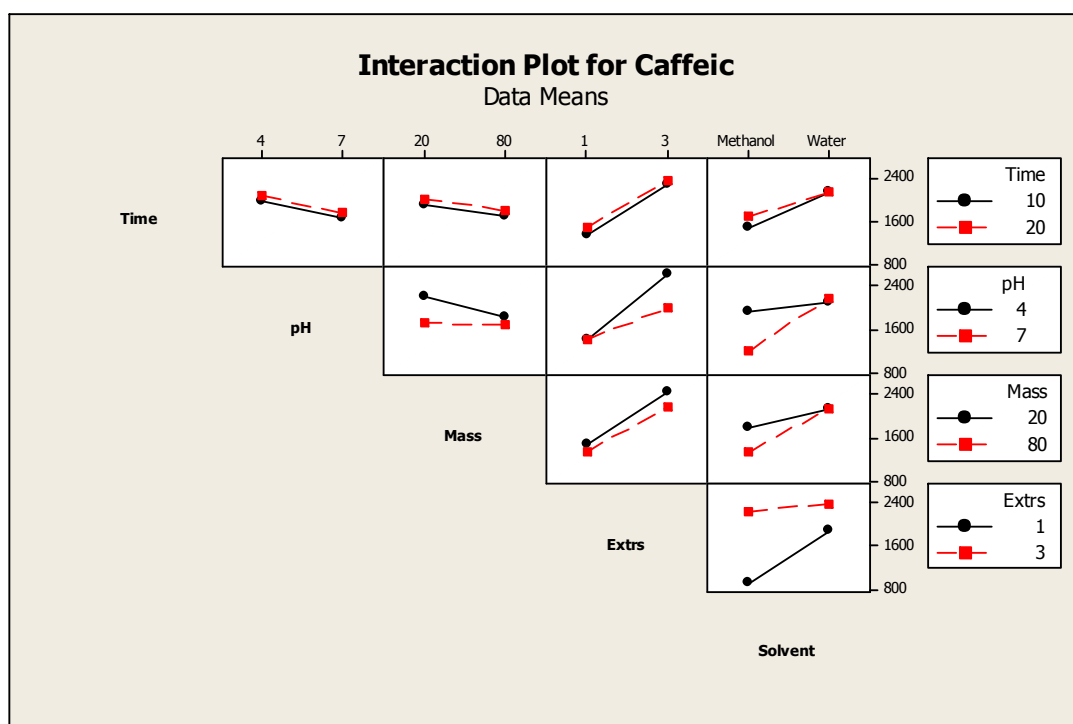


FIGURA 56 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO ENTRE DUAS VARIÁVEIS PARA O ÁCIDO CAFEICO

FONTE: O autor (2008)

Verifica-se que os efeitos de interação entre as variáveis pH e natureza do solvente, produzem melhores resultados quando se aumenta o pH de 4 para 7 e utilizando como solvente a água. A interação entre massa da amostra e natureza do solvente impõe melhores resultados na extração do ácido cafeico, quando a massa

da amostra é de 80 mg utilizando água como solvente. Não são significativos os efeitos de interação entre as variáveis, tempo de ultrassom com pH, massa de amostra e número de extrações, entre outros.

A influência dos efeitos principais e dos efeitos de interação entre duas variáveis é registrado pelo (GRÁFICO 2).

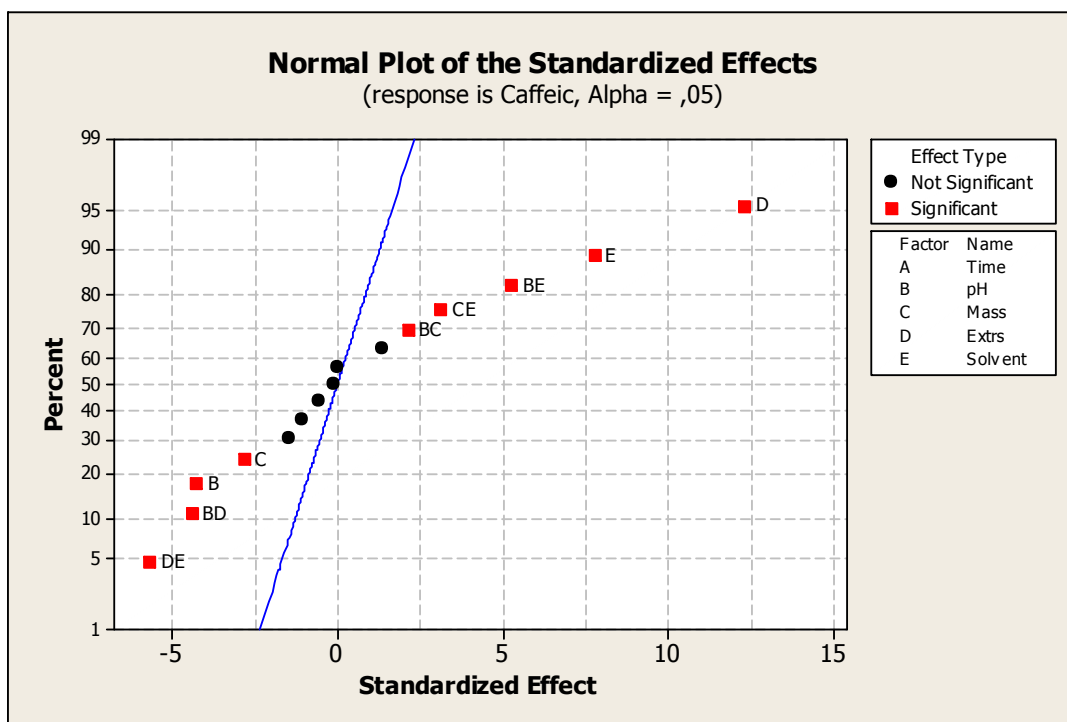


GRÁFICO 2 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CAFEICO DE AMOSTRA DE MATE
FONTE: O autor (2008)

Quando considerados os seus efeitos principais, individualmente, destaca-se que a variável D (número de extrações) exerce maior influência sobre a extração do ácido cafeico, seguida da variável E (natureza do solvente). As variáveis B (pH do líquido extrator) e C (massa de amostra) apresentam baixo valor de efeito e baixa influência, obtendo-se melhores resultados quando considerados os menores valores, tanto de pH quanto massa da amostra. O efeito principal A (tempo de ultrassom) não se mostrou significativo.

Os efeitos provocados pelas interações entre as duas variáveis BD, quando considerados os menores valores de pH, numa única extração e, ainda, as

interações entre as variáveis DE (número de extrações e natureza do solvente), executando menor número de extrações em solvente de menor polaridade (metanol), exercem baixa influência.

O número de extrações e a natureza do solvente, são as variáveis mais importantes na extração do ácido cafeico da amostra de erva mate comercial e as variáveis, pH do líquido extrator e massa da amostra, exercem baixa influência, quando avaliados os efeitos individuais. As variáveis, tempo de ultrassom e velocidade de centrifugação, não são significativas, podendo ser fixadas em apenas um nível nos planejamentos que envolvam extração do ácido cafeico nas amostras de erva mate comercial.

A combinação de fatores que melhor extrai o ácido cafeico das amostras de erva mate, inclui as condições impostas ao ensaio n° 31 (TABELA 4), adotando como procedimento a utilização de 80mg de amostra, dissolvidas em H₂O (solvente de maior polaridade), com maior pH (7), mantido em menor tempo no banho de ultrassom (10 minutos) e centrifugado a 5.000rpm. De acordo com a verificação das áreas de ácido cafeico obtidas nos ensaios realizados.

5.3.3 Ácido clorogênico

Para o ácido clorogênico a combinação entre os fatores que garantem extrações em maiores quantidades do composto está definida pelo experimento n° 32 (TABELA 2), que emprega maior massa de amostra (80mg), dissolvida em solvente de maior polaridade (H₂O), com maior pH (7), mantido em maior tempo no banho de ultrassom (20 minutos) e centrifugado na maior rotação (10.000rpm). Novamente, os efeitos principais, número de extrações e natureza do solvente apresentaram maior amplitude na variação das médias das áreas, representando significativas diferenças (95%), quando se aumenta o número de extrações de uma para três e quando se altera a natureza do solvente de metanol puro para água pura (FIGURA 57).

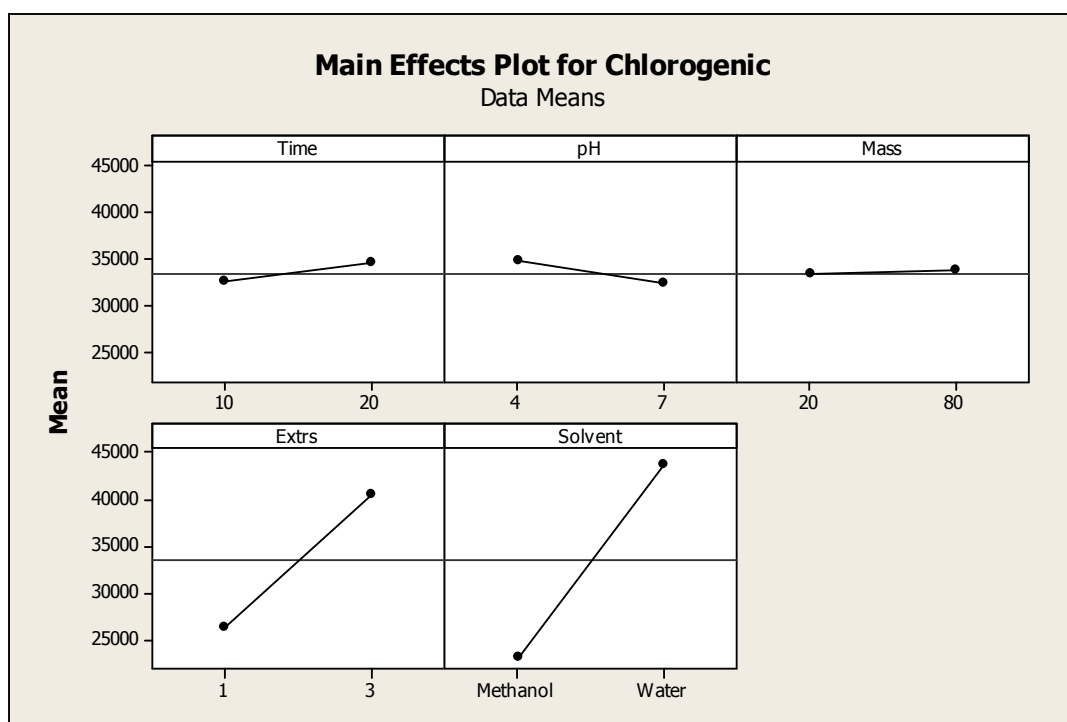


FIGURA 57 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS PRINCIPAIS PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO
FONTE: O autor (2008)

Verifica-se, através da (FIGURA 58), que os efeitos de interação entre as variáveis pH e natureza do solvente, produzem melhores resultados quando se aumenta o pH de 4 para 7 e utilizando como solvente a água. Já, para na interação entre massa da amostra e número de extrações, melhores resultados são alcançados quando a massa da amostra é de 80 mg, realizando três extrações. Exercem baixa influência as interações entre as variáveis, pH e número de extrações, quando considerados menores valores de pH numa única extração. Não são significativos os efeitos de interação entre as variáveis, massa de amostra, tempo de ultrassom e número de extrações, com a natureza do solvente, entre outros.

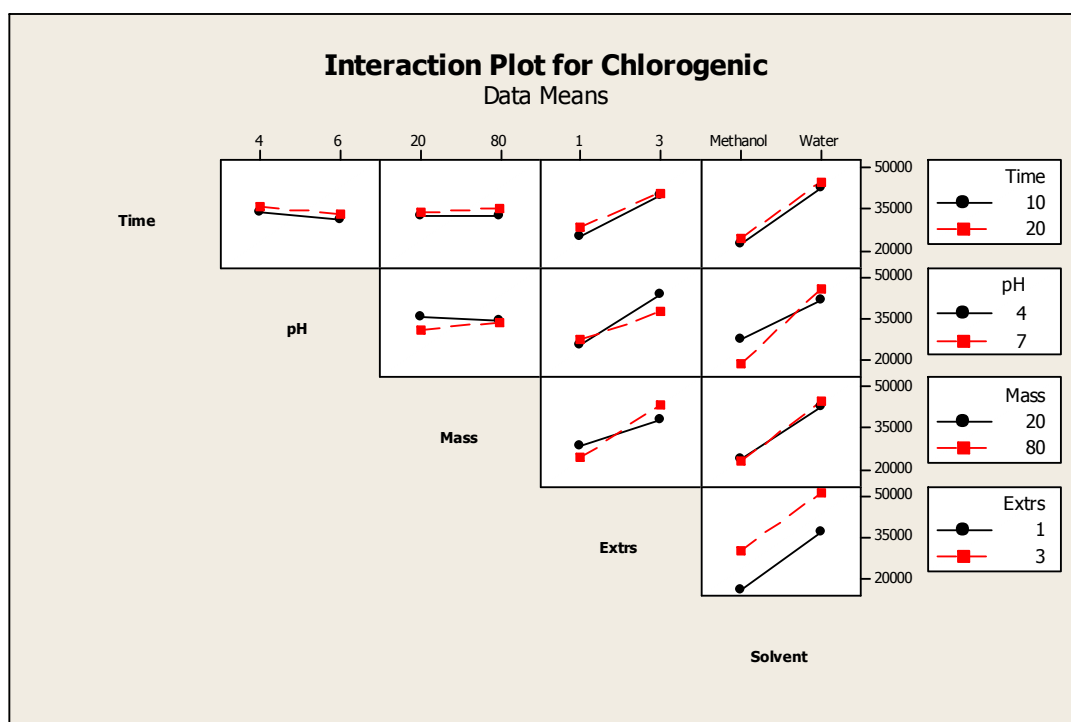


FIGURA 58 - INFLUÊNCIA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO ENTRE DUAS VARIÁVEIS PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO
FONTE: O autor (2008)

A influência dos efeitos principais e dos efeitos de interação entre duas variáveis (GRÁFICO 3), enfatiza que a variável E (natureza do solvente) exerce maior influência sobre a extração do ácido clorogênico, seguida da variável. D (número de extrações). A variável B (pH do líquido extrator) apresenta baixo valor de efeito e exerce melhor influência quando considerados os menores valores de pH (4).

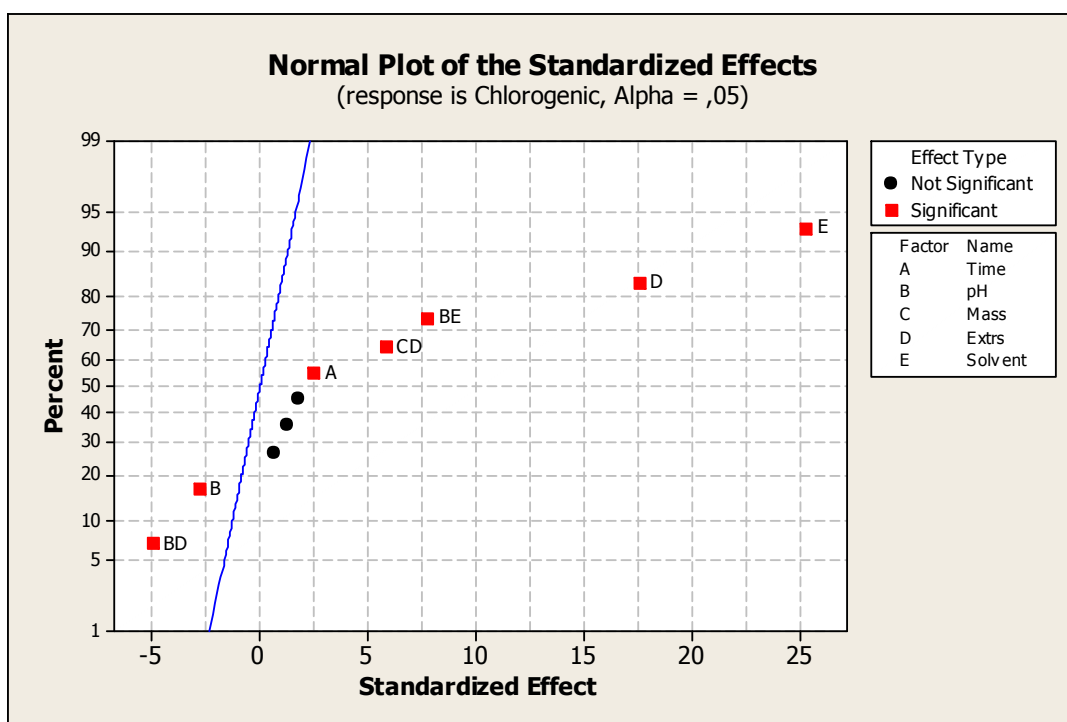


GRÁFICO 3 - GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS PADRONIZADOS DA EXTRAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO DE AMOSTRA DE MATE
FONTE: O autor (2008)

Assim, as variáveis, natureza do solvente e número de extrações, são as mais importantes na extração do ácido clorogênico da amostra de erva mate comercial e as variáveis, pH do líquido extrator e tempo de ultrassom, apresentam-se com baixos efeitos sobre a extração, quando considerados os seus efeitos principais. A massa da amostra e a velocidade de centrifugação não são significativas. Assim como para os outros analitos avaliados, a velocidade de centrifugação pode ser fixada em apenas um nível nos planejamentos que envolvam extração do ácido cafeico nas amostras de erva mate comercial.

A (TABELA 11) reúne os dados que compõem a combinação dos melhores efeitos para a extração dos analitos da erva mate comercial, descritos anteriormente.

TABELA 11 – COMBINAÇÃO DOS FATORES QUE MELHOR EXTRAEM OS ÁCIDOS QUÍNICO, CAFEICO E CLOROGÊNICO DAS AMOSTRAS DE ERVA MATE

	t_{us} (min.)	pH_{sv}	m_{am} (mg)	n_{ex}	sv	v_{cent} (r.p.m.)
Ácido quínico	20	7	80	3	H ₂ O	10.000 ^B
Ácido cafeico	10 ^A	7	80	3	H ₂ O	5.000 ^B
Ácido clorogênico	20	4	80 ^A	3	H ₂ O	10.000 ^B

t_{us} = tempo de ultrassom; pH_{sv} = pH do líquido extrator; m_{am} = massa da amostra; n_{ex} = número de extrações; sv = natureza do solvente; v_{cent} = velocidade de centrifugação; ^A Não significativos quando avaliados os efeitos principais e sim considerados os efeitos de interação entre duas variáveis; ^B Não significativos.

FONTE: O autor (2008)

5.4 QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A definição do método de quantificação, baseada nas condições ideais de análise e parâmetros do instrumento, é decisiva para a credibilidade do processo como um todo. Com este propósito a escolha da espectrometria de massas nesta etapa do experimento não foi por acaso. A sensibilidade proporcionada pelo método, permitindo a avaliação do analito em concentrações muito baixas, aliada à possibilidade de confirmar as estruturas dos compostos, ou grupos de compostos até então isolados, pela determinação de suas massas moleculares, como dado complementar na identificação dos compostos e a disponibilidade do equipamento pelo Laboratório Central do Estado do Paraná, contribuíram para a escolha da espectrometria de massas na quantificação dos metabólitos de interesse.

Na injeção de fluxo (FIA) foi acoplado ao espectrômetro de massas o cromatógrafo em fase líquida e injetadas no sistema CLAE-EM/EM cada uma dos padrões de interesse, para definição e ajuste dos tempos de retenção.

O experimento realizado em modo EM1 representa o primeiro passo da análise espectrométrica e define a melhor forma de ionizar a molécula. A (TABELA 12) registra as massas, encontradas no modo negativo, para os analitos:

quinida, ácidos cafeico, quínico, clorogênico, neoclorogênico e mistura de isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos.

TABELA 12 - MASSAS MOLECULARES, NO MODO NEGATIVO, DOS COMPOSTOS EM ANÁLISE ACRESCIDAS EM 1Da

ANALITO	MASSA OBTIDA +1 Da	MASSA CALCULADA (Da)	DIFERENÇA (Da)	FÓRMULA MOLECULAR
Quinida	174,1	174,15	0,05	C ₇ H ₁₀ O ₅
Ácido cafeico	180,1	180,16	0,06	C ₉ H ₈ O ₄
Ácido quínico	192,0	192,17	0,17	C ₇ H ₁₂ O ₆
Ácido clorogênico	354,1	354,31	0,21	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Ácido neoclorogênico	354,0	354,31	0,31	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Dicafeoilquínicos	516,3	516,45	0,015	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂

FONTE: O autor (2008)

Todos os compostos analisados tiveram seus espectros obtidos também em modo positivo. Este modo de análise implica em condições menos favoráveis para a ionização dos analitos, por ter sido usado acetato de amônio e acetato de sódio como aditivos na ionização. Estes aditivos são empregados na busca de melhorar as condições de ionização para o analito. O modo positivo revelou uma diversidade de íons moleculares (FIGURA 59 A) na forma de adutos com o amônio $[M + NH_4]^+$, ou com sódio $[M + Na]^+$, de acordo com o aditivo. Já, o modo negativo (FIGURA 59 B), mostrou condições favoráveis por proximidade da massa do íon molecular à massa real do analito.

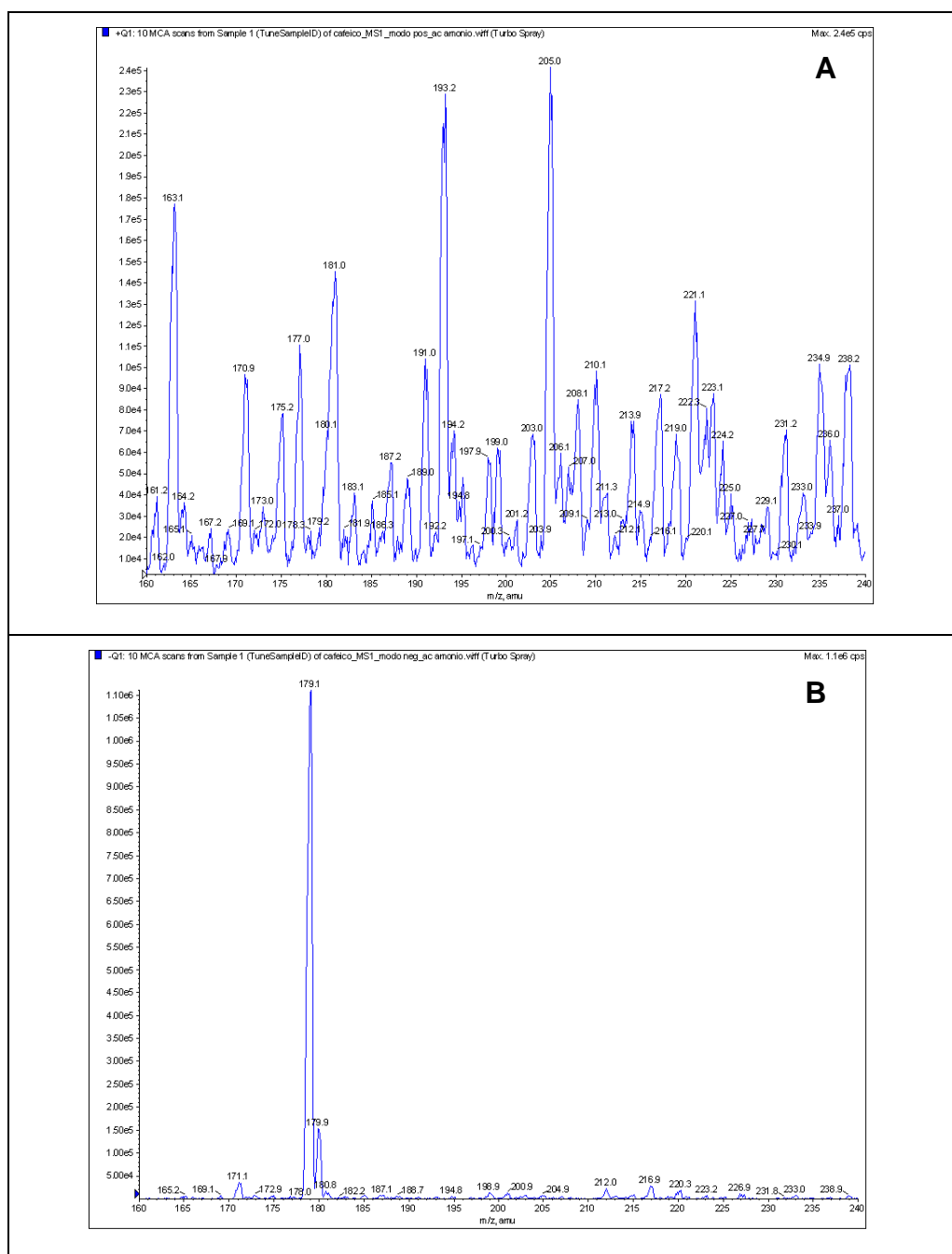


FIGURA 59 - ESPECTROS DE MASSAS (EM1) DO PADRÃO DE ÁCIDO CAFEICO:
A – MODO POSITIVO; B – MODO NEGATIVO
FONTE: O autor (2008)

A (TABELA 13) relaciona os íons pais ($[M-H]^-$) e alguns dos fragmentos secundários (EM2), íons filhos, dos compostos que serão quantificados nas amostras de erva mate.

TABELA 13 - ALGUNS DOS FRAGMENTOS ESI-EM/EM DOS COMPOSTOS AVALIADOS NOS EXTRATOS DAS AMOSTRAS DE ERVA MATE

ÍONS ESI-EM (<i>m/z</i>)						
COMPOSTO	ÍONS DESPRONOTADOS		ÍONS EM2		REFERÊNCIA	
	[M-H] ⁺	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> *			
Quinida	173	66,8	93,1	111,0	FRANK <i>et al.</i> (2008)	
Ácido cafeico	179	89,0	134,0	135,1	Padrão	
Ácido quínico	191	85,2	87,0	92,8	126,9	Padrão
Ácido clorogênico	353	85,1	92,9	127,2	191,1	CARINI <i>et al.</i> (1998)
						SCHÜTZ <i>et al.</i> (2004)
Ácido neoclorogênico	353	135,1	172,9	179,0	191,1	FANG <i>et al.</i> (2002)
						SCHÜTZ <i>et al.</i> (2004)
Ácidos dicafeoilquínicos	515	178,9	191,1	353,1	CLIFFORD <i>et al.</i> (2006)	
					SCHÜTZ <i>et al.</i> (2004)	

*Em negrito - íons quantificadores
 FONTE: O autor (2008)

No terceiro quadrupolo ocorre a seleção dos fragmentos obtidos, ou para análise confirmatória, ou para análise quantitativa por múltipla reação monitorada (MRM). Nesse modo, de análise, ambos os quadrupolos do detector EM-EM permanecem estáticos, promovendo um grande ganho para o analito, proporcionando alta seletividade e sensibilidade (BALIZS e HEWITT, 2003), resultando num cromatograma altamente específico de boa relação sinal/ruído.

Para as curvas de calibração, a (TABELA 14) reúne as equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação linear, utilizadas nos cálculos das concentrações dos analitos nas amostras de erva mate.

TABELA 14 – EQUAÇÕES DA RETA E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO LINEAR PARA OS ANALITOS

ANALITO	EQUAÇÃO	R ²
Ácido quínico	y = 166632x - 656,46	0,9983
Quinida	y = 1,08e6x - 1050	0,99585
Ácido neoclorogênico	y = 95224x - 10403	0,9926
Ácido clorogênico	y = 87996x - 10403	0,9949
Ácido cafeico	y = 87680x - 817,63	0,999

FONTE: O autor(2008)

A (TABELA 15) fornece, para 100g de amostra, as concentrações em miligramas do analito, mensuradas nas amostras de folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM).

TABELA 15 - CONCENTRAÇÕES (MG/100G DE AMOSTRA) DA QUINIDA E DOS ÁCIDOS QUÍNICO, CAFEICO, CLOROGÊNICO E NEOCLOROGÊNICO, NAS AMOSTRAS DE ERVA MATE

AMOSTRA		ÁCIDO CLOROGÊNICO mg/100g	ÁCIDO QUÍNICO mg/100g	ÁCIDO NEOCLOROGÊNICO mg/100g	ÁCIDO CAFEICO mg/100g	QUINIDA mg/100g
FVS	Média	4756,33	3364,60	1838,53	80,53	N.d.
	Desv Pad.	±107,46	±160,97	±130,29	±2,10	
EMC	Média	4070,79	2800,76	1482,91	54,77	N.D.
	Desv Pad.	±141,93	±83,64	±72,16	±1,81	
FT	Média	3403,05	1900,64	438,19	21,85	5,05
	Desv Pad.	±153,10	±60,26	±16,33	±2,71	±0,15
BCM	Média	1162,15	692,03	228,77	22,34	2,98
	Desv Pad.	±39,85	±40,91	±10,40	±1,49	±0,27

Valores médios \pm desvio padrão (n = 6) das amostras: folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM); N.D. – não detectado

FONTE: O autor (2008)

A quantificação dos compostos fenólicos em amostras de erva mate, ou em outras amostras (alimentos, vinhos e plantas), comumente se faz através do uso de CLAE. A (TABELA 16) reúne dados comparativos das concentrações dos ácidos clorogênico, neoclorogênico e cafeico em amostras de erva mate, encontrados na literatura.

TABELA 16 - DADOS COMPARATIVOS DAS CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO (CHA), NEOCLOROGÊNICO (NeoCHA) E CAFEICO EM AMOSTRAS DE ERVA MATE

REFERÊNCIA	INSTRUMENTO	AMOSTRA	Nº AMOSTRAS	CHA (mg/100g)	NeoCHA (mg/100g)	ÁC.CAFEICO (mg/100g)
PERES <i>et al.</i> (2007)	HPLC-DAD-ESI/EM	Chimarrão	6	906 - 1301	757 - 1198	
CARDOZO JUNIOR. <i>et al.</i> (2007)	HPLC	Infusão	16	786 - 932		14 - 20
HOFFMANN-RIBANI (2006)	HPLC	Chimarrão	12	1310 - 2470		N.D.
BASTOS <i>et al.</i> (2006)	HPLC	FVS	48	342 - 2213		
		FV	24	294 - 689		
FILIP <i>et al.</i> (2001)	HPLC	Infusão	1	2800		23
CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ (1990)	HPLC	Infusão	5	570 - 2020	270 - 2320	

FV - folha verde; FVS - folha verde seca

FONTE: O autor (2008)

Ainda que se considerem as enormes variações em sua constituição, influenciadas pelas regiões onde são cultivadas, iluminação, umidade, condições do solo, entre outros, as amostras de folhas verdes secas e erva mate comercial indicam valores superiores aos maiores teores encontrados na literatura. Em Filip *et al.* (2001), a infusão das folhas da planta apresentou teores de 2,8% para o ácido clorogênico e de 0,023% para o ácido cafeico. Nesta pesquisa, os teores foram de 4,8% e 0,081%, respectivamente. Para o ácido neoclorogênico Clifford e Ramirez-Martinez (1990), registraram teores entre 0,27% e 2,3% e no presente trabalho foram encontrados 1,8%. Além da sazonalidade e das características peculiares a cada planta, as melhores diferenças entre os teores encontradas nesta pesquisa, podem estar relacionadas às vantagens experimentais, como a definição dos parâmetros que melhor extraem os constituintes da folha e a escolha do método para quantificar os constituintes das amostras, através do espectrômetro de massas.

Largamente comentado em experimentos com erva mate, o ácido quínico dificilmente é quantificado, embora sua presença na erva mate não possa ser considerada menos importante. Suas concentrações chegaram a níveis superiores a 3% nas folhas verdes secas, 2,8% no produto comercial da erva mate e 1,9% nas folhas tostadas, responsáveis pela elaboração do chá mate. Sheng *et al.* (2005) associam o ácido quínico a um poderoso princípio ativo de um medicamento, que fornece suporte nutricional como um suplemento na dieta, pois melhora a reparação do DNA e a resposta de células imunes, conduzindo ao crescimento da inibição sem matar a célula. Sua ingestão também pode aumentar significativamente a excreção urinária do ácido hipúrico (AH) - empregado como indicador de exposição ocupacional ao tolueno - sendo esta excreção proporcional à dose de ácido quínico ingerida. Como a *Ilex paraguariensis* possui concentrações deste componente, superiores às aquelas presentes na maioria dos chás, é provável que esteja contribuindo para o aumento dos níveis de AH na urina de consumidores de chimarrão Fonseca, (2006).

De alguma maneira o aquecimento a que são submetidas as folhas, ativa um processo anti-estresse da planta, favorecendo a formação dos compostos fenólicos

e do ácido quínico, na maior proporção possível, como forma de resistência à elevação da temperatura que lhes é imposta (APÊNDICE 5). Isto não se aplica no caso das folhas tostadas, que também são submetidas à elevação de temperatura, uma vez que neste caso o aquecimento pode provocar a formação das lactonas dos ácidos cafeoilquínicos e do ácido quínico, como acontece no café, proporcionando evidente aumento na concentração da quinida e redução nas concentrações dos cafeoilquínicos durante o processamento das folhas secas em folhas tostadas.

A verificação dos resultados surpreendeu pela concentração dos isômeros do ácido clorogênico, que permanecem na borra do chá mate. Somam pelo menos 14g/Kg de resíduo. Ainda que não fossem considerados os valores dos ácidos dicafeoilquínicos (APÊNDICE 6), não mensurados, mas nitidamente visíveis através dos cromatogramas, a otimização da extração destes constituintes, assim como a possibilidade de implementar estudos de aplicação do resíduo, dariam às folhas da erva mate um máximo aproveitamento.

Importante ressaltar o conteúdo de quinida encontrado nas folhas verdes (APÊNDICE 7). Não há registro, até o momento, da presença desta substância nas folhas verdes, quanto mais sua quantificação. No presente trabalho foram encontrados, em 100g da amostra, 2,87 mg de quinida nas folhas verdes desidratadas; 1,80 mg nas folhas verdes; 5,05 mg nas folhas tostadas e 2,98 mg na borra do chá mate. Não foram detectadas concentrações de quinida nas amostras de erva mate comercial e folhas verdes secas.

As lactonas do ácido clorogênico são produtos da transformação na torrefação do café (FARAH, 2005; 2006; TRUGO, 1984). Na investigação dos constituintes das amostras verdes de erva mate, não foi confirmada a existência, por Clifford e Ramirez-Martinez (1990), da lactona do ácido neoclorogênico, reportada em relatos anteriores. Confiando na consistência dos seus resultados, o autor reforça a idéia de que sua presença poderia estar associada à de um artefato do ácido, em função da sua grande concentração nas plantas.

Como já apresentado em capítulo anterior, houve a preocupação de verificar em outras amostras de folhas verdes da planta a existência da γ -lactona do ácido quínico. Considerá-la artefato do ácido quínico em função de suas altas

concentrações seria indicar que sua presença deveria ocorrer nas folhas verdes secas e na erva mate comercial, cujos teores são numericamente superiores, aproximadamente 65 vezes, aos encontrados em nas folhas verdes. No entanto ressalta-se que sequer foram detectadas nas folhas verdes secas, e sim nas folhas verdes, onde teores de ácido quínico são menores.

Tendo isolado a mistura dos isômeros do ácido clorogênico e na impossibilidade de quantificar o ácido 4-cafeoilquínico (ácido criptoclorogênico), fez-se o registro do seu tempo de retenção e a medida das áreas médias dos sinais emitidos. Nas folhas verdes desidratadas e nas folhas verdes o composto não foi detectado. Nas folhas verdes secas, erva mate comercial e nas folhas tostadas, os ácidos neoclorogênico e criptoclorogênico mantiveram regularidade na proporção de área de 2,2 a 2,4 vezes. A mesma proporção se fez entre os ácidos clorogênico e neoclorogênico nas folhas verdes desidratadas, secas e na erva mate comercial. Do ácido clorogênico para o ácido criptoclorogênico essa proporção aumenta em 18 vezes nas folhas tostadas e 22 vezes na borra do chá mate. Concentrações entre 290 e 900 mg/100g de amostra foram registradas por Clifford e Ramirez-Martinez (1990), para o ácido criptoclorogênico, valores 8 vezes inferiores aos registrados para o ácido neoclorogênico e 7 vezes menores que os valores registrados para o ácido clorogênico.

A mesma situação descreve a condição dos dicafeoilquínicos. Na impossibilidade de mensurá-los em concentração, fez-se o registro dos seus tempos de retenção através da injeção dos isômeros isolados da erva mate e das suas áreas nas amostras analisadas. Suas concentrações se fazem presentes, em maior intensidade, nas amostras de folhas verdes secas (APÊNDICE 5) e erva mate comercial (APÊNDICE 8), superando, inclusive, as áreas registradas para qualquer isômero do ácido clorogênico nas mesmas amostras.

Valores superiores do ácido 3,5-dicafeoilquínico também foram registrados por Clifford e Ramirez-Martinez (1990) quando comparados a qualquer um dos isômeros do ácido clorogênico. Foram encontradas, em três de suas cinco amostras de mate verde e chá mate, valores entre 2600 mg/100g a 2820 mg/100g do 3,5-dicafeoilquínico, entre 1430 mg/100g a 2020 mg/100g para o ácido clorogênico e

1750 mg/100g a 2320 mg/100g para o ácido neoclorogênico. No subtotal, os isômeros dos dicafeoil ficaram em concentrações menores, valores entre 4030 mg/100g a 4560 mg/100g dos dicafeoil e 4530 mg/100g a 4710 mg/100g para os cafeoil. Peres *et al.* (2007) registrou teores até 1,75 vezes favoráveis ao ácido neoclorogênio, quando comparados seus maiores teores aos menores do 3,5-dicafeoil, e de 1,6 vezes superiores ao 4,5-dicafeoil quando comparados seus limites superiores aos inferiores do ácido clorogênico, concordando com as evidências mostradas nos cromatogramas. Distorções foram percebidas entre os diferentes autores quanto ao número de isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos quantificados, Clifford e Ramirez-Martinez (1990) avaliaram três, concordando tanto em quantidade quanto em concentrações com o relato de Filip *et al.* (2001). Peres *et al.* (2007) avaliaram dois dos isômeros. Para os primeiros autores o ácido 3,5-dicafeoilquínico aparece em maior concentração e, para os segundos, o 4,5-dicafeoilquínico.

5.5 ÁCIDO CAFEICO TOTAL

Até o momento tem-se tratado da quantificação dos fenólicos livres nas amostras de erva mate, a (TABELA 17) registra as concentrações do ácido cafeico após processo de hidrólise alcalina e hidrólise alcalina na presença de EDTA 10 mmol/L e ácido ascórbico 1% (EDTA-ascorbato). A hidrólise alcalina com EDTA-ascorbato previne, completamente, a degradação dos ácidos fenólicos suscetíveis à ação oxidativa (NARDINI *et al.*, 2002).

TABELA 17 - CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO CAFEICO NAS AMOSTRAS DE ERVA MATE HIDROLISADAS NA AUSÊNCIA (HIDRÓLISE 1) E NA PRESENÇA DE EDTA 10MMOL L⁻¹ E ÁCIDO ASCÓRBICO 1% (HIDRÓLISE 2).

AMOSTRA		ÁCIDO CAFEICO (mg/100g)	
		HIDRÓLISE 1	HIDRÓLISE 2
FVS	Média	74,39	2321,54
	Desv Pad.	±3,26	±269,53
EMC	Média	63,10	2267,51
	Desv Pad.	±1,91	±238,48
FT	Média	59,70	1255,55
	Desv Pad.	±5,98	±77,64
BCM	Média	62,85	706,05
	Desv Pad.	±6,95	±89,29

Valores médios ± desvio padrão (n = 6) das amostras hidrolisadas: folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM)
 FONTE: O autor (2008)

A concentração do ácido cafeico, tanto na Hidrólise 1, quanto na Hidrólise 2, resultou em maiores teores nas amostras de folhas verdes secas e erva mate comercial, assim como são maiores os teores de ácidos clorogênico e neoclorogênico nas mesmas amostras não hidrolisadas.

As reduções nas concentrações de ácido cafeico, relacionando a hidrólise das folhas verdes secas com as concentrações das folhas não hidrolisadas, indicaram comportamento destoante das demais amostras e sem registro equivalente. De modo geral, os resultados obtidos da hidrólise tornaram-se aquém das expectativas. O objetivo inicial de avaliar o conteúdo de cafeicos totais, nas amostras de erva mate, tornou-se conflitante pela desproporção entre os elevados teores de cafeoil e dicafeoilquínicos, encontrados nas amostras não hidrolisadas e os teores resultantes do produto da hidrólise, o ácido cafeico. Quantidades maiores de ácido quínico também eram esperadas. Entretanto, seus resultados surpreenderam quando seus teores reduziram na mesma proporção que os seus ésteres com o cafeico (clorogênico, neoclorogênico e dicafeoilquínicos). Estequiometricamente a hidrólise de um mol de moléculas de ácido clorogênico deve originar um mol de moléculas de ácido quínico e um mol de moléculas de ácido cafeico.

A (FIGURA 60) revela o comportamento dos analitos e do ácido cafeico na hidrólise alcalina na presença de EDTA-ascorbato da amostra de folha verde seca da erva mate.

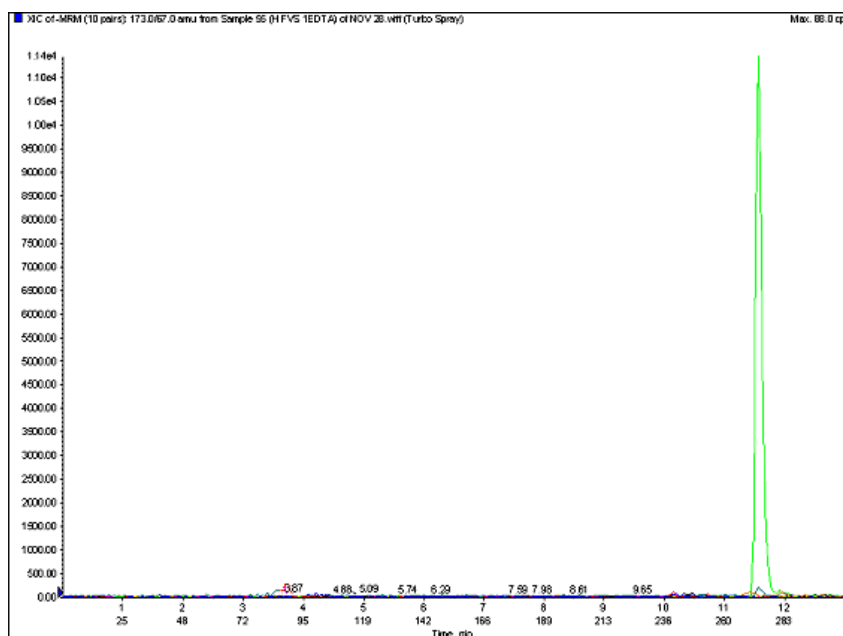


FIGURA 60 - CROMATOGRAMA DA HIDRÓLISE ALCALINA NA PRESENÇA DE EDTA-ASCORBATO DA AMOSTRA DE FOLHA VERDE SECA DA ERVA MATE

FONTE: O autor (2008)

Sem sombra de dúvidas, mérito seja feito à participação do EDTA e ácido ascórbico na reação, quando comparados com os efeitos provocados na hidrólise sem EDTA. A conjugação de ambos, ácido ascórbico prevenindo oxidações que afetem as amostras e o EDTA quelando os fenólicos e evitando perdas, atingiu teores de ácido cafeico de 4000% na concentração do ácido em relação às amostras não hidrolisadas (GRÁFICO 4) e elevando-se, surpreendentemente, nas amostras de folha tostada, a aproximadamente 5600%. Ao passo que na hidrólise sem EDTA, estes valores não ultrapassaram 300%.

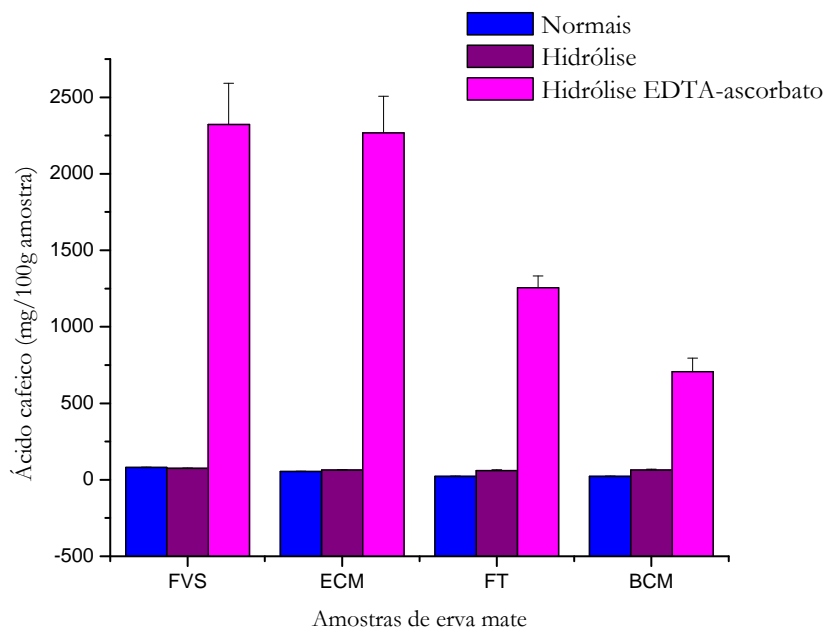


GRÁFICO 4- CONCENTRAÇÕES DO ÁCIDO CAFEICO DETERMINADAS VIA CLAE-EM/EM, NAS AMOSTRAS NORMAIS E AMOSTRAS SUBMETIDAS À HIDRÓLISE, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE EDTA-ASCORBATO

Amostras: folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM)

FONTE: O autor (2008)

De alguma maneira o desenvolvimento experimental incorreu em erros ainda não identificados. Supostamente na fase de separação dos conteúdos hidrolisados com acetato de etila, grande quantidade dos compostos polares, existentes na fração aquosa, não foi extraída pela fase orgânica, resultando em concentrações abaixo do esperado.

A (TABELA 18) faz registro dos percentuais médios de recuperação do ácido cafeico, nos ensaios do branco, onde variações nas condições de hidrólise permitiram avaliar o comportamento do analito. Destaque à recuperação do ácido cafeico em presença de ácido ascórbico.

TABELA 18 - PERCENTUAIS MÉDIOS DE RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO NA HIDROLISE DO BRANCO

BRANCO		B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6
RECUPERAÇÃO	Média (%)	55,56	7,80	6,57	5,59	95,89	106,60
	Desv Pad.	±1,20	±1,22	±0,90	±0,35	±4,33	±3,13

Valores médios \pm desvio padrão (n = 3) para B 1 - sem NaOH; B 2 - NaOH 2 mol/L; B 3 - NaOH 2 mol/L e EDTA 10^{-2} mol/L; B 4 - NaOH 2 mol/L e EDTA 10^{-1} mol/L; B 5 - NaOH 2 mol/L e ácido ascórbico 1%; B 6 - NaOH 2 mol/L, EDTA 10^{-2} mol/L e ácido ascórbico 1%

FONTE: O autor (2008)

Nardini *et al.* (2002) com estes procedimentos experimentais executados sobre amostras de café e maçã e Nardini e Ghiselli (2004) em amostras de cerveja, em seus relatos, enaltecem os resultados encontrados, tanto pelas elevadas concentrações obtidas do ácido cafeico quanto pela preservação da amostra pelo EDTA-ascorbato, ao evitar as oxidações espontâneas. Esta pesquisa encontra-se em concordância com as afirmações do autor para a recuperação do ácido cafeico no branco com EDTA-ascorbato (Branco 6), foi realmente excelente; porém, não há relato do efeito da matriz sobre os resultados, indicando se existe ou não influência dos demais constituintes das amostras sobre os resultados.

5.6 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A resposta para a avaliação do conteúdo de compostos fenólicos é dada pelo número de grupos fenólicos na amostra e a intensidade de cor depende da formação do molibdotungstofosfato, azul, como resultado da oxidação dos fenólicos pelo reagente molibdotungstofosfórico (amarelo). A principal vantagem da metodologia de Folin-Ciocalteu é que mantém uma resposta equivalente para diferentes substâncias fenólicas nos materiais biológicos tornando adequadas as medidas dos níveis de fenólicos (CHUN e KIM, 2004).

O conteúdo de compostos fenólicos avaliado através da relação massa, em g, de ácido cafeico/100g de amostra está representado na (TABELA 19)

TABELA 19 - CONTEÚDO DOS FENÓLICOS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE ERVA MATE

AMOSTRAS	N	ABSORBÂNCIAS MÉDIA	INTERVALO DE CONFIANÇA ± DESV.PAD./RAIZ N (t = 95 %)	MASSA DE ÁCIDO CAFEICO (g)/100 g AMOSTRA
FVS	6	0,6497	0,0187	8,7364
EMC	5	0,9371	0,0449	7,7261
FT	6	0,4709	0,0295	6,1422
BCM	6	0,8004	0,0439	2,7260

Amostras de folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM); n= número de replicatas consideradas através do teste Q; Absorbâncias em UV a 760 nm
 FONTE: O autor (2008)

Os valores foram obtidos por regressão linear da curva padrão do ácido cafeico ($R^2=0,9971$) e a composição das médias das absorbâncias feita por seleção entre leituras, através do teste Q, uma forma de comparação entre amostras, que visa estabelecer a existência de diferença significativa entre elas.

Não foram encontrados valores referenciais que reproduzissem as mesmas condições desenvolvidas para este experimento, com amostras de erva mate. Turkmen, Sari e Velioglu (2006), indicaram para as folhas tostada $6,42 \pm 0,136$ g de ácido gálico/100g amostra. Deladino *et al.* (2008), obtiveram teores de $6,21 \pm 0,116$ g, também expressos em g de ácido gálico/100g de folhas tostadas do chá mate. Filip *et al.* (2000), com valores expressos em equivalentes de ácido clorogênico registraram para a totalidade dos compostos fenólicos $6,96 \pm 0,31$ g para uma amostra de erva mate comercial e $6,83 \pm 0,28$ g para uma segunda amostra.

Estabelecendo-se um comparativo em gráfico das concentrações de fenólicos totais (g de ácido cafeico/100g de amostra), avaliadas nas amostras de erva mate, percebe-se um comportamento semelhante aquele obtido para as folhas verdes (FV e FVD) quando da quantificação dos analitos (baixos teores), além da crescente redução quando as amostras são submetidas à tosta (FT) e ao processo de extração para a elaboração do chá mate (BCM).

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Muitas propriedades atribuídas às plantas estão associadas à presença de compostos fenólicos e à sua capacidade antioxidante, essenciais ao desenvolvimento da planta e aos seus mecanismos de defesa. No consumo alimentar dos seres humanos incluem-se propriedades benéficas à saúde, especialmente aos derivados do cafeoil (FILIP *et al.*, 2000; 2001; MAZZAFERA, 1997; CLIFFORD and RAMIREZ-MARTINEZ, 1990).

Entre os testes utilizados para avaliar o potencial antioxidante das plantas, encontra-se a capacidade dos extratos em capturar o radical livre e estável de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Sua cor violeta permite absorção com comprimento de onda de 517 nm e, na presença de um doador de hidrogênio, uma substância antioxidante capaz de capturar radicais livres, a coloração diminui estequiometricamente proporcional ao número de elétrons capturados. A captura do radical livre depende não apenas do conteúdo de fenólicos, mas também de tipo de composto fenólico e ocorre através de diferentes mecanismos, incluindo deslocalização de elétrons e a formação de ligações de hidrogênio intramolecular (BASTOS, 2007).

A relação entre a concentração das amostras de erva mate, contendo substâncias antioxidantes capazes de capturar o radical livre DPPH e a porcentagem de inibição do radical proporcional à capacidade da amostra (GRÁFICO 5), está representada abaixo.

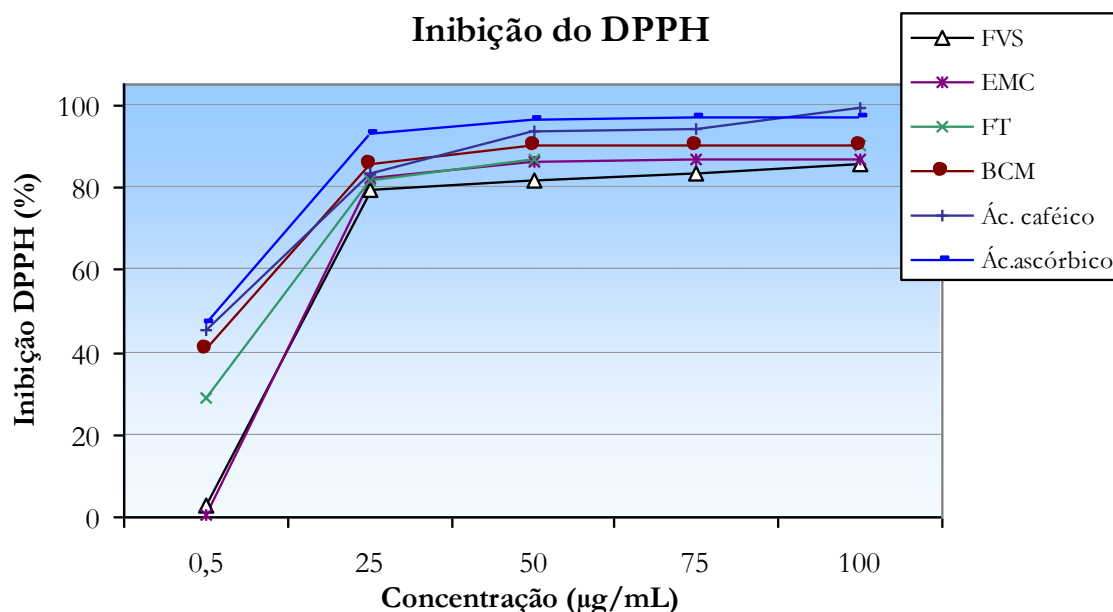


GRÁFICO 5 - PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH PARA OS PADRÕES DO ÁCIDO CAFEICO E ÁCIDO ASCÓRBICO PARA AS AMOSTRAS DE ERVA MATE, EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS E PADRÕES

Amostras: folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM)

FONTE: O autor (2008)

À medida que se aumentam as concentrações das amostras de erva mate, proporcionalmente aumenta o consumo de DPPH e diminui seu potencial no meio. Todas as amostras testadas inibem, no mínimo 80%, do radical DPPH com concentrações de 25 µg/mL. O ácido ascórbico alcança, nesta concentração, 97% da inibição do radical livre e a amostra de FVS 86%. Acima destas concentrações, ocorre redução no ritmo de captura de elétrons e a relação entre as substâncias antioxidantes, presentes nas amostras de erva mate, e o DPPH pouco altera. Com este procedimento experimental é possível determinar qual a concentração da amostra inibe totalmente a presença do radical livre no meio, através do preparo de soluções mais concentradas.

Outra maneira de representar este comportamento é adotando um dos padrões como referência de concentração em substância antioxidante, capaz de promover 50, 70 ou até 90% da inibição do DPPH. Grandezas estas conhecidas como IC₅₀, IC₇₀, ou IC₉₀. A (TABELA 20) registra as concentrações das amostras e

padrões, equivalentes ao ácido cafeico, em micrograma por mililitro de solução, que causam 50% da inibição do radical DPPH (IC_{50}).

TABELA 20 - ATIVIDADE CAPTADORA DO RADICAL DPPH (IC_{50})

PADRÕES/AMOSTRAS	IC_{50} (antilog)	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$ /mL)	IC_{50} ($\mu\text{g eq. ác.caf/mL}$)
Ácido ascórbico	-5,460	3,47	0,63
Ácido cafeico	-4,902	12,53	2,26
FVS	-3,956	110,66	19,94
EMC	-3,984	103,75	18,69
FT	-4,162	68,87	12,41
BCM	-4,387	41,02	7,39

Folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM); IC_{50} = concentrações das amostras e dos padrões, que causam 50% da inibição do radical DPPH

FONTE: O autor (2008)

A determinação das concentrações foi obtida por regressões exponenciais dos pontos plotados graficamente (FIGURA 61), relacionando os inversos dos logaritmos das concentrações micromolares das amostras e padrões, em função da porcentagem de inibição que cada concentração provoca no radical livre DPPH, utilizando-se dos valores médios das triplicatas de cada um dos experimentos.

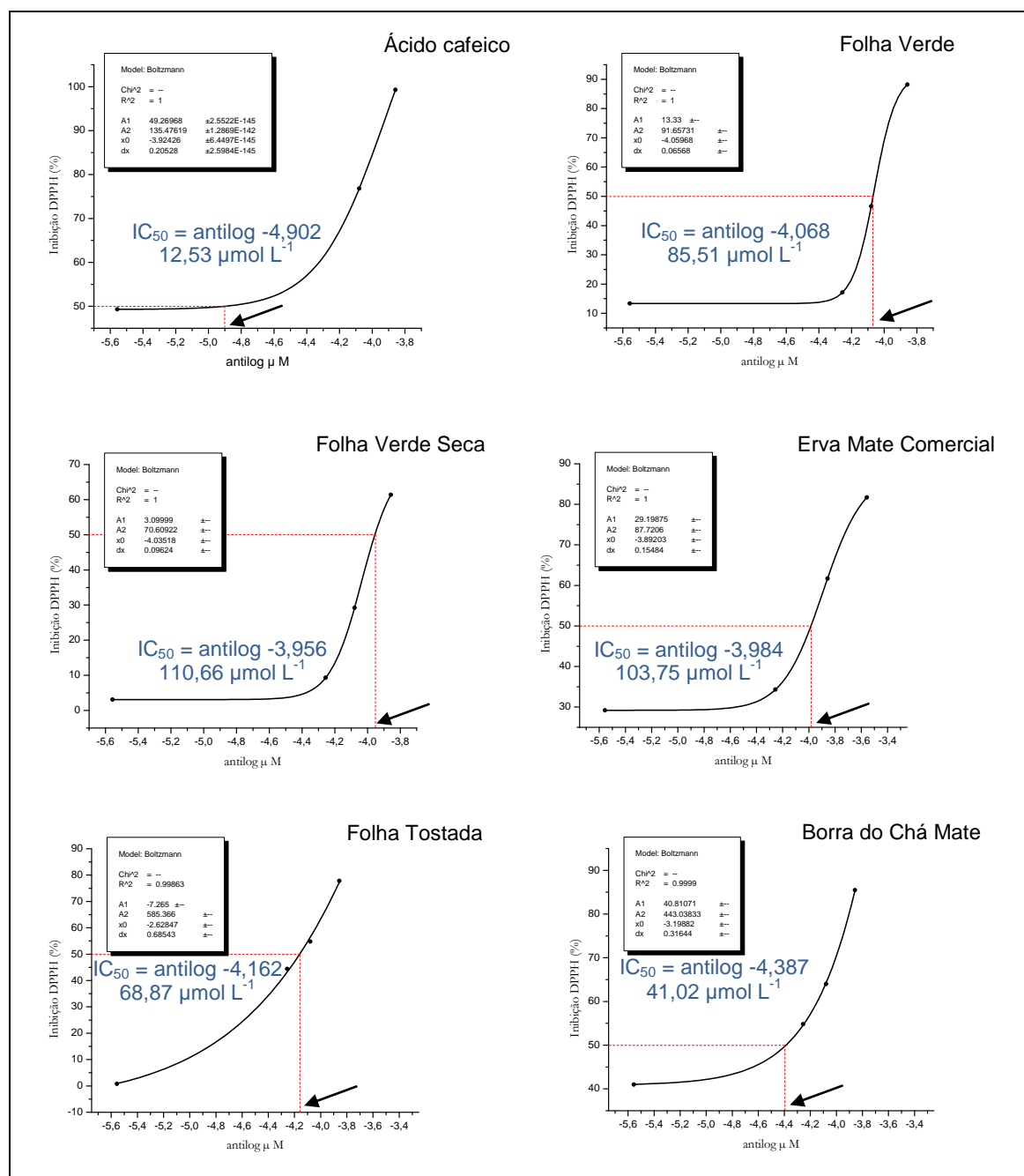


FIGURA 61 - CURVAS EXPONENCIAIS DAS CONCENTRAÇÕES, EM $\mu\text{mol L}^{-1}$, DAS AMOSTRAS DE ERVA E DOS PADRÕES DOS ÁCIDOS CAFEICO E ASCÓRBICO, QUE CAUSAM 50% DA INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH, EM FUNÇÃO DOS ANTILOGARÍTIMOS DAS CONCENTRAÇÕES

FONTE: O autor (2008)

A opção por escala logarítmica seguiu modelo proposto por Ramirez-Moraes (2004). As concentrações dos ácidos cafeico e ascórbico foram expressas em micromol/mL (10^{-6}) e a regressão exponencial, normalmente usada para caracterizar

quantidades que aumentam, ou diminuem, a uma taxa proporcional à sua própria magnitude, fornece o melhor ajuste para a dispersão dos pontos da função (GRÁFICO 6), basta observar os valores de R^2 .

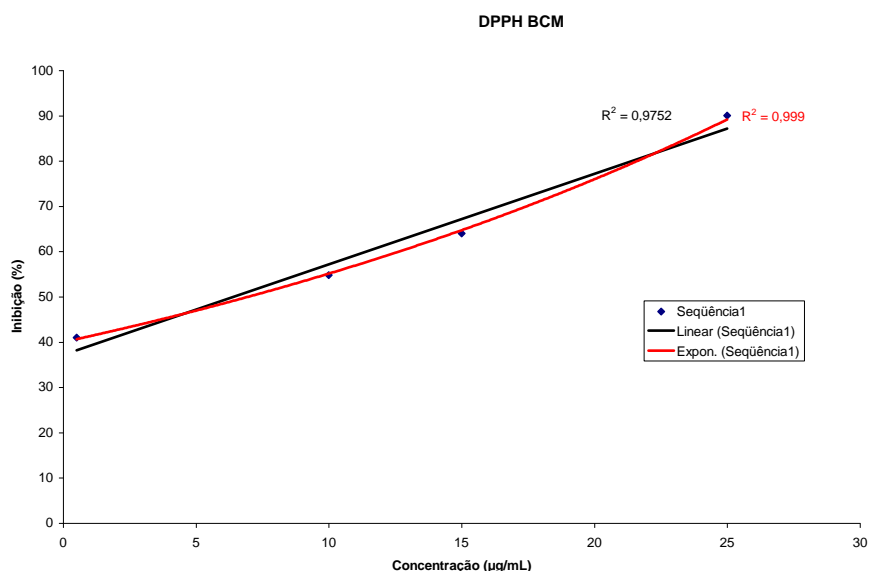


GRÁFICO 6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS AJUSTES DA FUNÇÃO CONCENTRAÇÃO X PERCENTAGEM INIBITÓRIA POR REGRESSÃO LINEAR E EXPONENCIAL
FONTE: O autor (2008)

Aos resultados da (TABELA 20), chega-se através das seguintes relações:

Sendo:

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{1 + e^{\frac{x - x_o}{dx}}} + A_2$$

Então:

$$x = x_o + \ln\left(\frac{(A_1 + A_2)}{(y - A_2)} - 1\right) \cdot dx$$

Portanto:

		Ácido ascórbico	Ácido caféico	FV	FVS	EMC	FT	BCM
	$A_1 =$	2,47407	49,26968	13,33	3,09999	29,19875	-7,265	40,81071
	$A_2 =$	104,63571	135,47619	91,64731	70,60922	87,7206	586,366	443,0383
	$x_0 =$	-5,35706	-3,92426	-4,05968	-4,03518	-3,89203	-2,62847	-3,19882
	$d_x =$	0,73562	0,20528	0,06568	0,09624	0,15484	0,68543	0,31644
Para	$y =$	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
então	$x =$	-5,460	-4,902	-4,068	-3,956	-3,984	-4,162	-4,387

Entre os valores obtidos, o padrão de ácido ascórbico demonstrou ser mais ativo que os demais compostos, seguido do ácido caféico e das amostras de borra do chá mate, das folhas tostadas e das folhas verdes da erva mate (GRÁFICO 7).

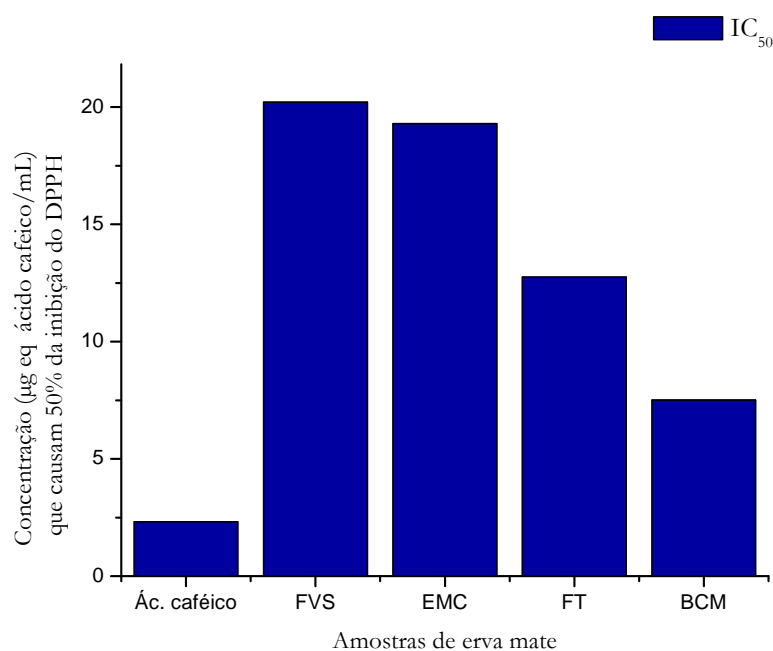


GRÁFICO 7 - CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS DE ERVA E DO PADRÃO DO ÁCIDO CAFEICO, QUE CAUSAM 50% DA INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH

Amostras: folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM)

FONTE: O autor (2008)

Também foram obtidos resultados utilizando as concentrações de ácido ascórbico como referência, as alterações nas leituras finais da atividade antioxidante

foram mínimas. Tendo em vista que o ácido cafeico é um constituinte natural das amostras, optou-se representar os resultados por equivalentes ao cafeico.

Alguns autores demonstraram uma correlação linear entre o conteúdo de compostos fenólicos e suas capacidades antioxidantes, enquanto outros mostraram fraca correlação linear ou não comentaram (WOJDYLO, OSMIANSKI e CZEMERY, 2007). Esta relação entre as duas grandezas depende principalmente das características do substrato (DELADINO *et al.*, 2008). Através do encapsulamento de diferentes extratos liofilizados de erva mate com dois diferentes sistemas, alginato de cálcio e alginato de cálcio-quitosana, os autores correlacionaram ($R^2 = 0,978$) satisfatoriamente o conteúdo de polifenóis e a atividade antioxidante.

Não foram encontradas, na presente pesquisa, correlações entre as grandezas mencionadas para qualquer uma das amostras avaliadas e suas capacidades antioxidantes.

Bastos *et al.* (2007), afirmam que a presença do cafeoil-glucose (derivado glicosilado do ácido cafeico) e do ácido feruloilquínico, nos extratos do mate tostado, ajudam a explicar porque as folhas tostadas apresentam uma capacidade antioxidante superior ao extrato do mate verde. Os autores ainda afirmam que o espectro ESI-EM registra um maior número de íons para o extrato de erva mate tostada em comparação ao da erva mate verde, comprovando a formação destes compostos durante o processamento.

Entretanto, quando comparadas estas amostras com as concentrações de ácidos clorogênico, neoclorogênico, cafeico e a concentração de fenólicos totais (GRÁFICO 8), percebe-se semelhança no comportamento das amostras, ainda que não comprovada estatisticamente.

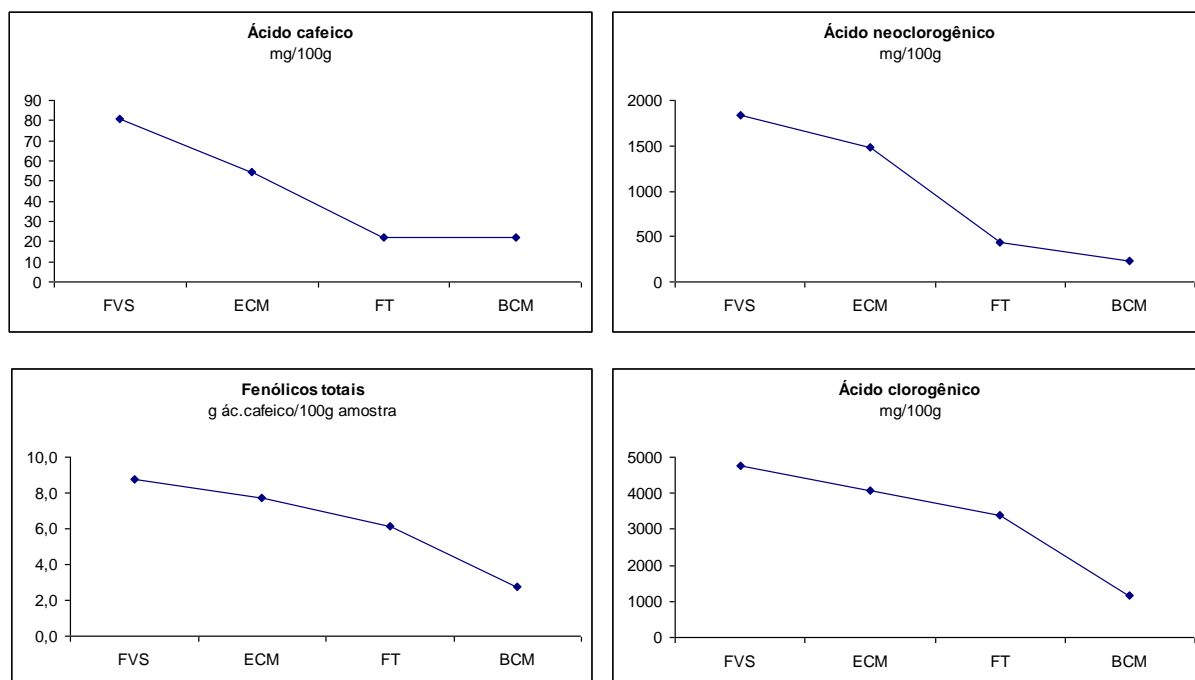


GRÁFICO 8 - CONCENTRAÇÕES DOS ÁCIDOS CAFEICO, NEOCLOROGÊNICO, CLOROGÊNICO E CAFEICOS TOTAIS PARA AS AMOSTRAS DE ERVA MATE

Amostras: folha verde seca (FVS), erva mate comercial (ECM), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM)

FONTE: O autor (2008)

Quando os valores das concentrações são normalizados (GRÁFICO 9) percebe-se ainda mais essa correlação. As medidas de cada grandeza foram divididas pelo maior valor entre elas para manter a proporcionalidade, enquanto comparadas.

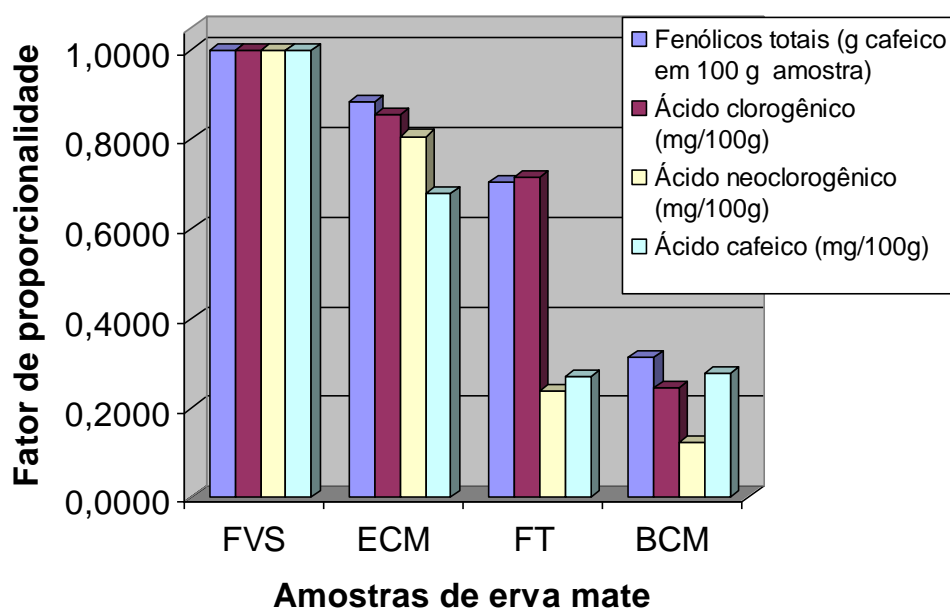


GRÁFICO 9 - AVALIAÇÃO DO PERFIL QUANTITATIVO DAS CONCENTRAÇÕES NORMALIZADAS DOS ÁCIDOS CAFEICO, NEOCLOROGÊNICO, CLOROGÊNICO E CAFEICOS TOTAIS, PARA AS AMOSTRAS DE ERVA MATE

Amostras: folha verde seca (FVS), erva mate comercial (EMC), folha tostada (FT) e borra do chá mate (BCM)

FONTE: O autor (2008)

Percebe-se que à medida que as folhas de erva mate evoluem no processamento industrial, de folhas verdes secas até a borra, as concentrações dos compostos fenólicos diminuem. O ácido neoclorogênico sofreu as maiores reduções quando as folhas verdes secas foram tostadas e o ácido clorogênico quando produzido o chá mate, evidenciado pela baixa concentração na borra, em relação às folhas verdes secas. O ácido cafeico livre reduziu gradativamente com o processamento, permanecendo praticamente inalterado quando da elaboração do chá mate. Como a concentração do ácido clorogênico é majoritária entre os compostos constituintes das diferentes amostras de erva mate, tal evidência reforça sua influência sobre os fenólicos totais.

6 CONCLUSÕES

A busca por método cromatográfico eficiente para o isolamento dos isômeros dos ácidos cafeoil e dicafeoilquínicos culminou em resultados satisfatórios. As altas polaridades e acentuada capacidade de oxidação dos constituintes fenólicos, não impediram o isolamento do ácido neoclorogênico e dos isômeros dos ácidos dicafeoilquínicos de uma matriz tão complexa, como o extrato bruto da erva mate.

A metodologia analítica empregada para quantificação e confirmação das estruturas dos compostos foi, sem dúvida, fator relevante para a valorização do trabalho. Destaque seja dado aos teores encontrados para os ácidos clorogênico, quínico e cafeico livre, nas amostras avaliadas, seguindo proposta bem sucedida de um planejamento fatorial para extração. A conjugação de ambos, equipamento e planejamento, mostraram-se fortes aliados na análise fitoquímica.

Já, a descoberta da existência da γ -lactona do ácido quínico, a quinida, nas amostras das folhas verdes do mate, foi surpreendente. Nada foi encontrado na literatura revisada que mencionasse sua existência nestas amostras. Assim como nada foi encontrado que registrasse investigação do conteúdo da borra do chá mate.

Como perspectivas, este trabalho de pesquisa abre novas frentes na investigação da provável presença das lactonas dos ácidos cafeoil e dicafeoil quínicos nas amostras de folhas verdes e nos produtos industrializados da erva mate, assim como na possibilidade de avaliar o aproveitamento do resíduo descartável do chá mate, a borra, que conserva teores de compostos fenólicos em teores nada desprezíveis. Cabe ainda, propor metodologia para validação do método de análise, como forma de aprimorar os recursos disponibilizados pelo espectrômetro de massa na investigação dos compostos da erva mate, garantindo análises mais rápidas e de baixo custo.

7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, Cláudia Alexandra de *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ANESINI, Claudia; FERRARO, Graciela; FILIP, Rosana. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 459-464, 2006.

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos—uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ANTOLOVICH, Michael *et al.* Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v.125, n. 5, p. 989-1009, 2000.

BARCO, Achille *et al.* d-(-)-Quinic acid: a chiron store for natural product synthesis. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 21, p. 3515-3545, 1997.

BARROS NETO B.; SCARMINIO I. S.; BRUNS R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.

BASTOS, Deborah H.M. *et al.* Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

BASTOS, Deborah H. M. *et al.* Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-432, 2007.

BECHO, Juliana Raso Marques; MACHADO Hussen; GUERRA, Martha de Oliveira. Rutin — Structure, Metabolism and Pharmacological Potency. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, enviado para publicação, 2008.

BECKER, Eleonora Miquel; NISSEN, Lise R.; SKIBSTED, Leif H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 6, p. 561-571, 2004.

BORTOLOTI, João Alexandre *et al.* Conseqüências da análise incorreta de experimentos bloqueados. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 436-440, 2007.

BOTTOLI, Carla B. G., *et al.* Poly(methyloctylsiloxanes) thermally immobilize on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 948, n. 1, p. 121-128, 2002.

BRAVO Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**; v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CAMPOS, L. C. in MOÇO, A. **A erva mate contra o mal de Parkinson**. Disponível em: <http://saude.abril.com.br/edicoes/0286/medicina/conteudo_236230.shtml>. Acesso em: 06/12/2007.

CARINI, M. *et al.* Characterization of phenolic antioxidants from Maté (*Ilex Paraguayensis*) by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, n. 22, p. 1813-1819, 1998.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. in: SIMÕES, CLÁUDIA MARIA DE OLIVEIRA, *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed., Editora da UFSC, 1999.

CHUDA, Yoshihiro *et al.* Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2037-2039, 1996.

CHUN, Ock Kyoung; KIM, Dae-Ok. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. **Food Research International**, v. 37, n. 4, p. 337-342, 2004.

CIRIO, Gianna Maria; RÜCKER, Neusa Gomes de Almeida. Ecofisiologia da erva-mate e os parâmetros legais. In: MAZUCHOWSKI, Jorge Zbigniew (Coord.). **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Projeto Plataforma Tecnológica da Erva-Mate do Paraná, Série PADCT n. 1, Curitiba, 2000.

CLIFFORD, Michael N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, Michael N.; RAMIREZ-MARTINEZ, Jose R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 13-21, 1990.

CLIFFORD, Michael N. *et al.* Characterization by LC-MSn of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p.1957-1969, 2006

CROTTI, Antônio Eduardo Miller *et al.* Espectrometria de massas com ionização por “electrospry”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DELADINO, Lorena *et al.* Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 1, p. 126-134, 2008.

DE MARIA, Carlos Alberto Bastos; MOREIRA, Ricardo Felipe Alves. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DE JESUS, Daniel Altino. **Determinação de Resíduos de Avermectinas no Leite por CLAE-EM/EM**, Curitiba, 131 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

DICKO, Mamoudou H. *et al.* Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 1, n. 1, p. 21-38, 2006.

DUARTE, M.F.T.N. **Espectrometria de massa de electrospray – técnica do presente e do futuro, 2000**. Disponível em: <<http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/604/article/3000954/pdf>> Acesso em: 28/04/2008.

FANG, Nianbai; YU, Shangong; PRIOR, Ronald L. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3579-3585, 2002.

FARAH, Adriana *et al.* Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1505-1513, 2005.

FARAH, Adriana *et al.* Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arábica coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 374-381, 2006.

FENGLIN, Hu *et al.* Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 14-23, 2004.

FENN, John B. Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 4, n. 7, p. 524-535, 1993.

FILIP, Rosana *et al.* Antioxidant Activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FILIP, Rosana. *et al.* Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FOLIN, Otto; CIOCALTEU, Vintila. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.

FONSECA, Estefânia Perin *et al.* Interferência do consume de chimarrão nos níveis de ácido hipúrico urinário. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 3, p. 163-165, 2006.

FRANK, Oliver *et al.* Structure determination of 3-O-caffeoyl-epi- γ -quinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9581–9585, 2008.

FRANKEL, Edwin N.; MEYER, Anne S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

GE HEALTHCARE. **Sephadex LH-20**. Instructions 56-1190-1197 AD., 2006.

GILLET, Françoise *et al.* Chlorogenic acid in a *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 869-874, 1999.

GNOATTO, Simone C.B.; SCHENKEL, Eloir P.; BASSANI, Valquiria. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723-725, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HECK, Caleb I.; DE MEJIA, E. Gonzalez. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

KING, Amy; YOUNG, Gloria. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KOLAKOWSKI, Beata M.; GROSSERT, J. Stuart; RAMALEY, Louis. Studies on the Positive-Ion Mass Spectra from Atmospheric Pressure Chemical Ionization of Gases and Solvents Used in Liquid Chromatography and direct Liquid Injection. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 15, n. 3, p. 311-324, 2004.

LEAL, CLaudenize Pontes da Silva. **Isolamento e quantificação de marcadores químicos de *Centella asiatica* L. e *Cynara scolymus***. Curitiba, 60 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LENZ, Cesar Antonio. **Síntese da 5-metil-2-oxabicyclo[3.3.1]non-7-eno-3,6-diona. Determinação estrutural de uma lactona bioativa isolada de *Otoba parvifolia***. Curitiba, 207 p. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

LUNCEFORD, Nicole; GUGLIUCCI, Alejandro. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.

LUTHRIA, Devanand L. Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 14, p. 2266-2272, 2006.

MACHADO, Carla Carolina Batista *et al.* Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva mate (*Ilex paraguariensis*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 513-518, 2007.

MAISUTHISAKUL, Pitchaon; PONGSAWATMANIT, Rungnaphar; GORDON, Michael H. Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). **Food Chemistry**, v.100, n. 4, p. 1620-1629, 2007.

MAZUCHOWSKI, J. Z. (Coord.) **Patentes industriais e as prioridades para os investimentos tecnológicos na cadeia produtiva da erva mate**. Projeto Plataforma Tecnológica da Erva mate do Paraná, Série PADCT n. 2, Curitiba, 2000a.

MAZUCHOWSKI, J. Z. (Coord.) **Normativos legais e as prioridades para pesquisas tecnológicas na cadeia produtiva da erva mate**. Projeto Plataforma Tecnológica da Erva mate do Paraná, Série PADCT n. 3, Curitiba, 2000b.

MAZZAFERA, Paulo. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997.

MINITAB 15. **Statistical Software**. Certificada pela Minitab Inc. (2007).

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v.1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NARDINI, M.; *et al.* Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 119-124, 2002.

NARDINI, M.; GHISELLI, A. Determination of free and bound phenolic acids in beer. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 137-143, 2004.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2 ed. Campinas, Editora Unicamp, 2003.

NOGUEIRA, Márcia; TRUGO, Luiz Carlos. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 296-299, 2003.

OLTHOF, Margreet R.; HOLLMAN, Peter C.H.; KATAN, Martijn B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of Nutrition**, v.131, n. 1, p. 66-71, 2001.

DOS SANTOS PEREIRA, Alberto *et al.* Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, Suplemento, S107-S111, 2005.

PERES, Renato Garcia *et al.* **HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity**. Campinas, 179 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, 2007.

PERES, Renato Garcia; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **Quantification of phenolic compounds and purine alkaloids in *Ilex paraguariensis* infusions**. Campinas, 179 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RAMALHO, Valéria Cristina e JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

ROBARDS, Kevin *et al.* Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.

ROBBINS, Rebecca J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

RUCKER, N.G.A. **Análise do agronegócio da erva-mate**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Departamento de Economia Rural, 1996.

SALDAÑA, Marleny D.A *et al.* Extraction of Purine Alkaloids from Maté (*Ilex paraguariensis*) Using Supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3804-3808, 1999.

SAMPAIO, Taís Santos. **Estudo fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes: isolamento, determinação estrutural e atividade biológica**. São Cristovão, 148 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciência Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão 2008.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed., Editora da UFSC, 1999.

SCHINELLA, G.R *et al.* Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHOLZ-BÖTTCHER, Barbara M.; ERNST, Ludger; MAIER, Hans Gerhard. New stereoisomers of quinic acid and the lactones. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 10, p. 1029– 1036, 1991.

SCHUBERT, Alexandre *et al.* Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. ST. - HIL. (erva mate) em Ijuí e Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SCHÜTZ K. *et al.* Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4090-4096, 2004.

SCOTTI, Luciana *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 3-12, 2007.

SHAHIDI, F; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic; 1995.

SHARMA, Ramesh K.; FISHER, Travis S.; HAJALIGOL, Mohammad R. Effect of reaction conditions on pyrolysis of chlorogenic acid. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 62, n. 2, p. 281-296, 2002.

SHEARER, Jane *et al.* Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3529-3532, 2003.

SHENG, Yezhou *et al.* An active ingredient of cat's claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 577-584, 2005.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

TAVARES, Leila Aley; FERREIRA, Antonio Gilberto. Análises quali e quantitativa de cafés comerciais via ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 911-915, 2006.

TOLONEN, Ari *et al.* Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and H-NMR methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 6, p. 316-328, 2002.

TONHI, Edivan; COLLINS, Kenneth E.; COLLINS, Carol H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica II. Chromatographic evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 948, n. 1, p. 109-119, 2002.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 219-227, 1984.

TURKMEN, Nihal; SARI, Ferda; VELIOGLU, Y. Sedat. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 835-841, 2006.

VALDUGA, Eunice. **Caracterização química e anatômica da folha de (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. Curitiba, 97 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VECHIA, Luciana Dalla; GNOATTO, Simone C. B.; GOSMANN, Grace. **Derivados Oleananos e Ursanos e sua Importância na Descoberta de Novos Fármacos com Atividade Antitumoral, Anti-Inflamatória e Antioxidante**. Submetido à publicação, 2008.

WAGNER, H. e BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. 2th ed, Springer. 1995.

WOJDYLO, Aneta; OSZMIANSKI, Jan; CZEMERY, Renata. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940-949, 2007.

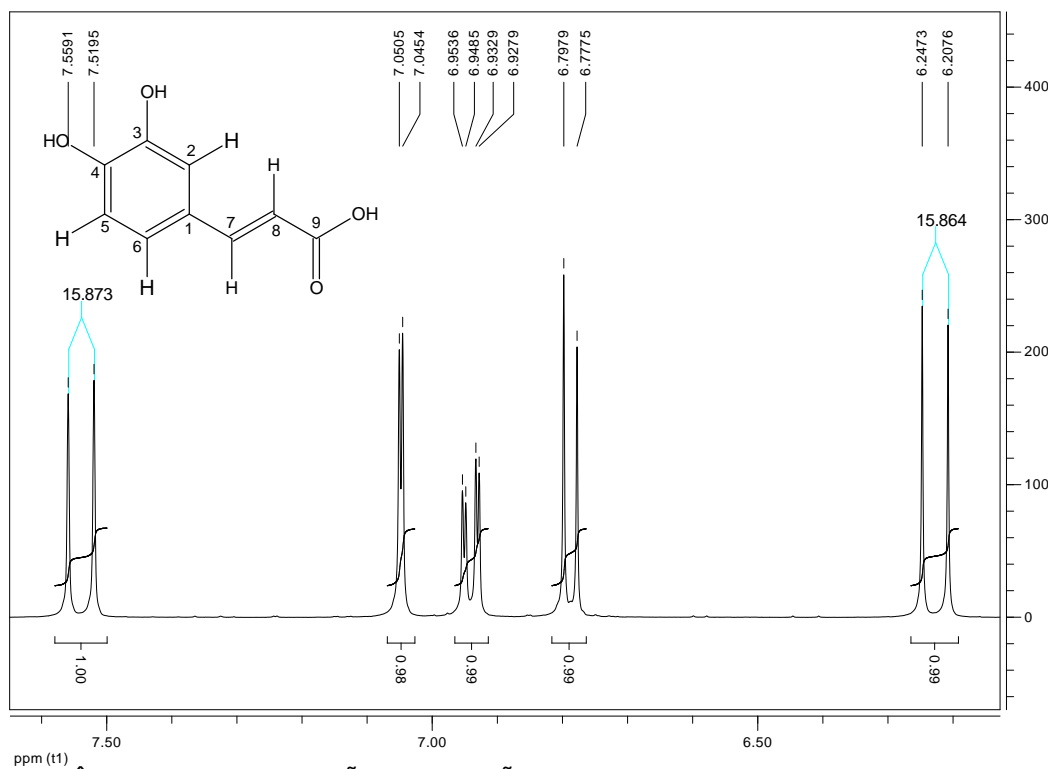
YOSHIMOTO, Makoto *et al.* Enzymatic production of caffeic acid by koji from plant – Resources containing caffeoylquinic acid derivatives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 69, n. 9, p. 1777-1781, 2005.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**. v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.

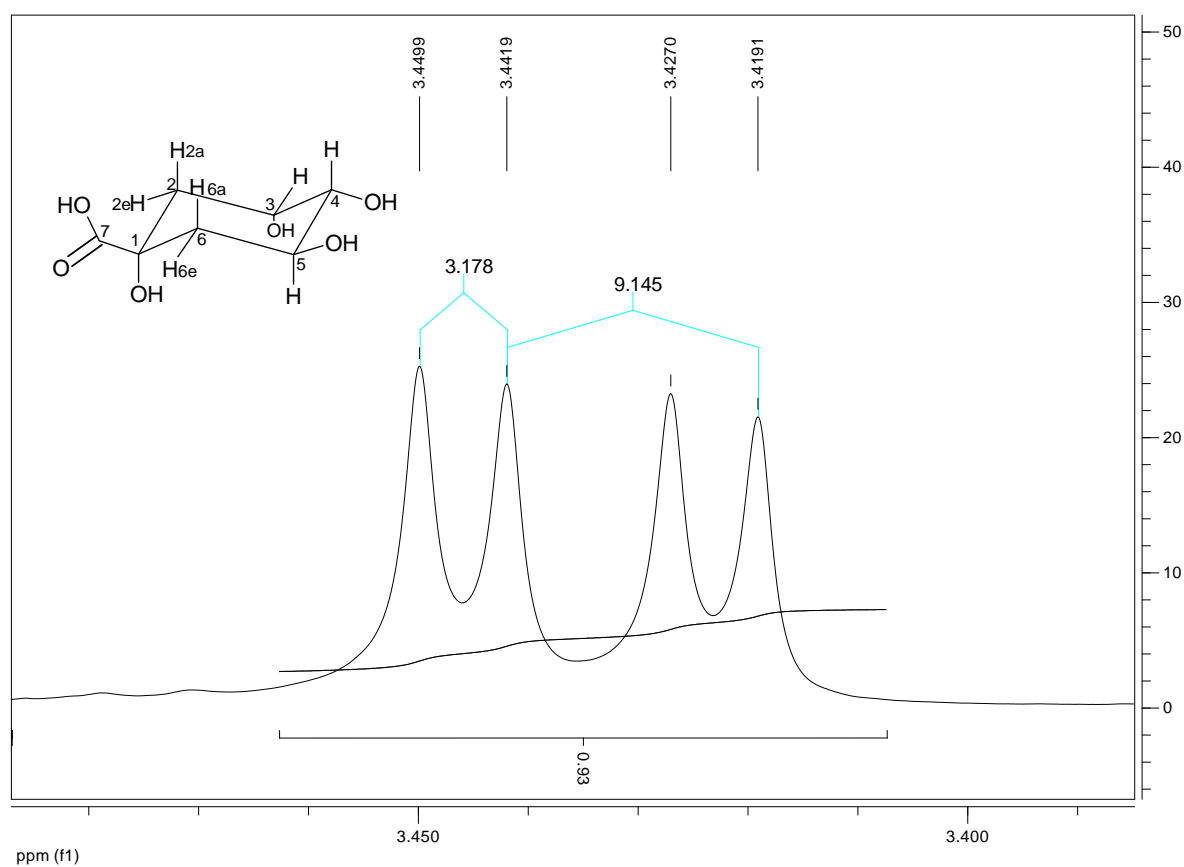
APÊNDICES

APÊNDICE 1 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO CAFEICO	163
APÊNDICE 2 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,20 PPM E 7,60 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO CAFEICO	164
APÊNDICE 3 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 3,39 PPM E 3,48 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO QUÍNICO	165
APÊNDICE 4 - ESPECTRO DE DEPT-135 DO ÁCIDO QUÍNICO	166
APÊNDICE 5 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE FOLHA VERDE SECA DA ERVA MATE	167
APÊNDICE 6 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE BORRA DO CHÁ MATE ..	168
APÊNDICE 7 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE FOLHA VERDE DESIDRATADA DA ERVA MATE	169
APÊNDICE 8 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE ERVA MATE COMERCIAL	170

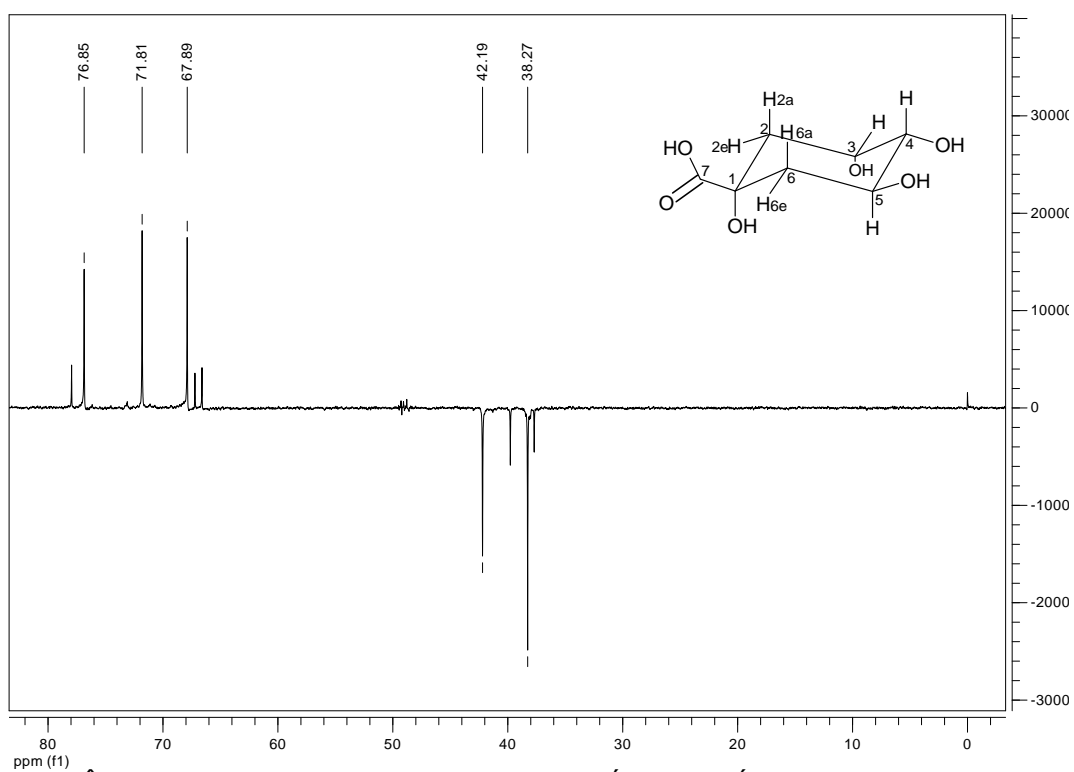




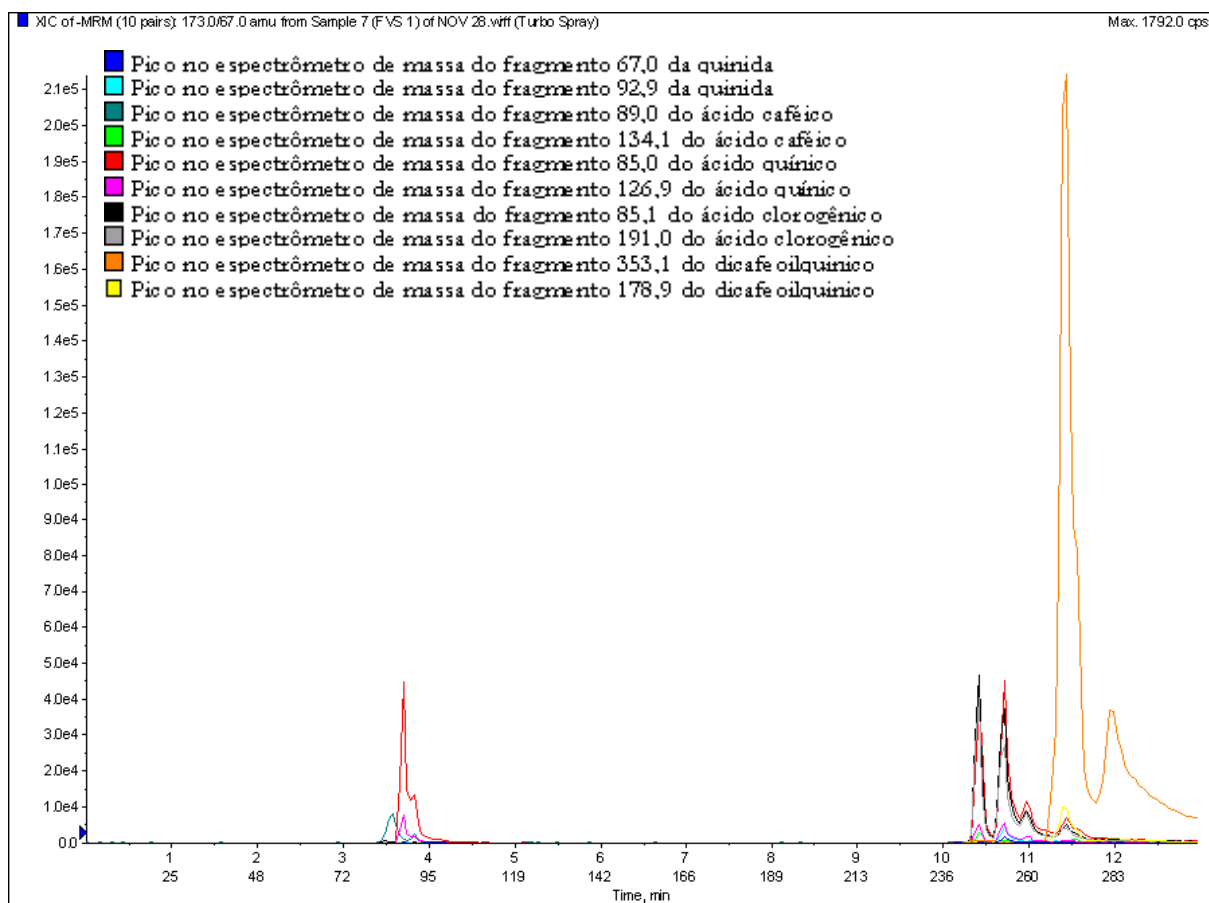
APÊNDICE 2 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 6,20 PPM E 7,60 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO ÁCIDO CAFEICO



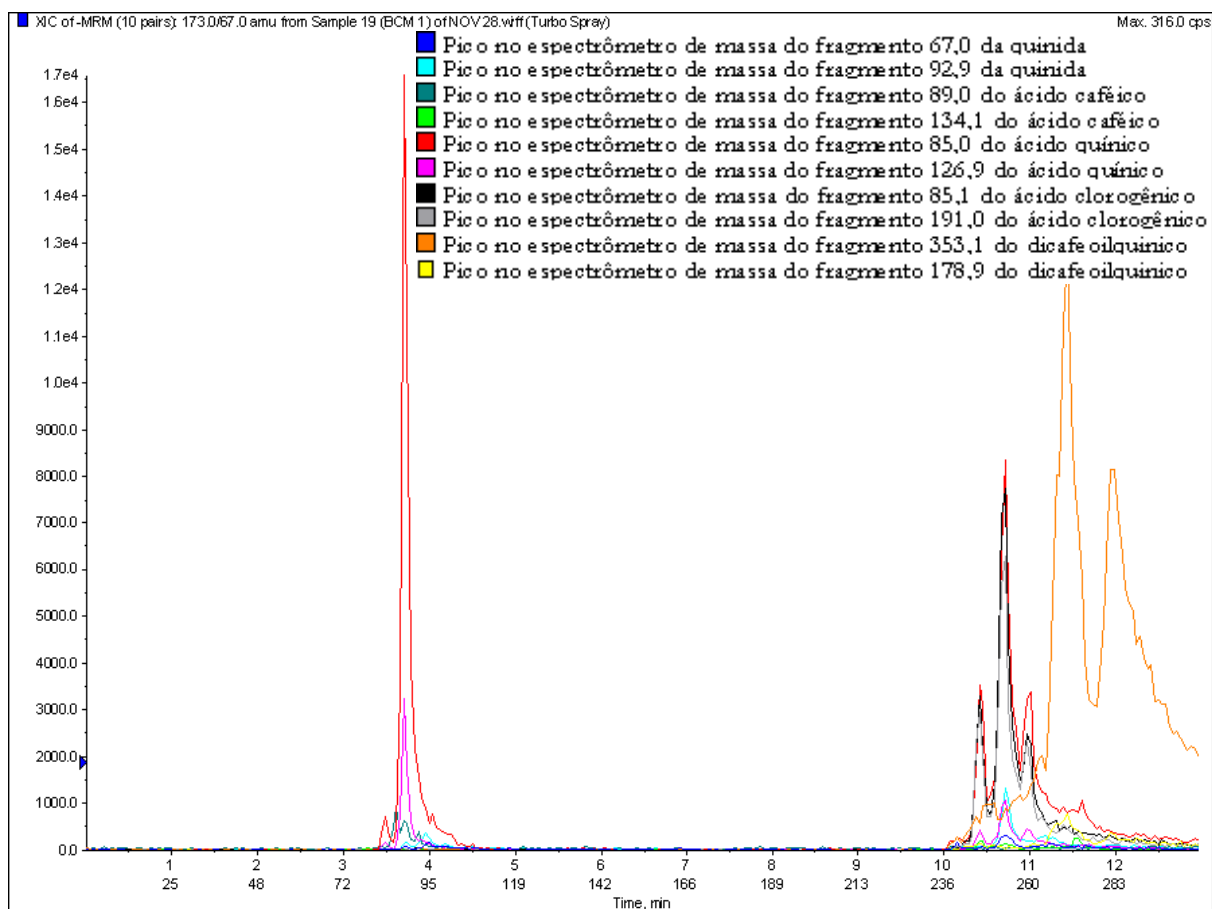
APÊNDICE 3 - AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 3,39 PPM E 3,48 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ¹H DO ÁCIDO QUÍNICO



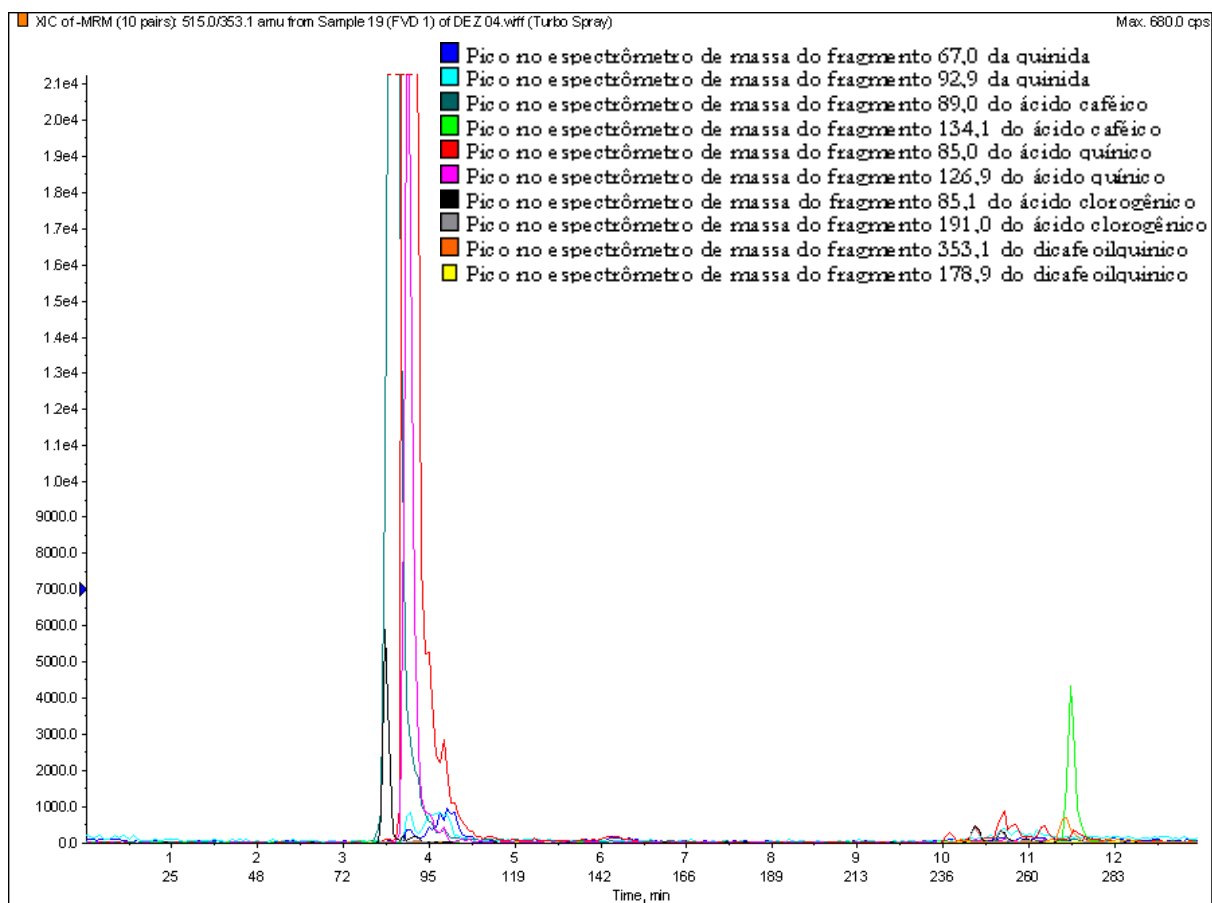
APÊNDICE 4 - ESPECTRO DE DEPT-135 DO ÁCIDO QUÍNICO



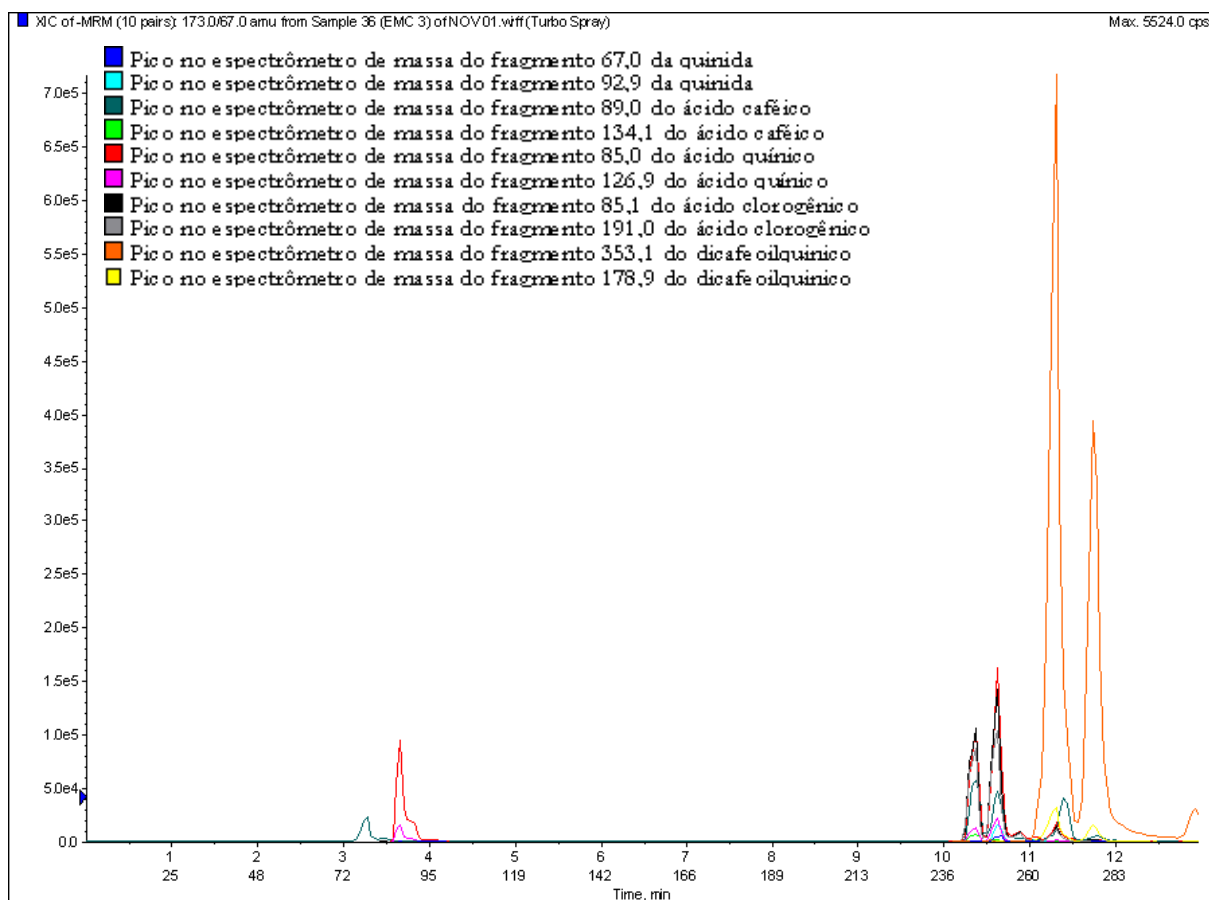
APÊNDICE 5 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE FOLHA VERDE SECA DA ERVA MATE



APÊNDICE 6 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE BORRA DO CHÁ MATE



APÊNDICE 7 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE FOLHA VERDE DESIDRATADA DA ERVA MATE



APÊNDICE 8 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE ERVA MATE COMERCIAL